

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



**Resistencia a antibióticos betalactámicos en
Enterobacteriaceae y Pseudomonas aeruginosa**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Jesús Martínez Beltrán

Director

Emilio Bouza Santiago

Madrid 2005

ISBN: 978-84-8466-889-3

© Jesús Martínez Beltrán, 1992

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS

EN *Enterobacteriaceae* Y *Pseudomonas aeruginosa*.

Jesús Martínez Beltrán

Tesis Doctoral

Departamento de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense de Madrid

1992



El Dr. D. Emilio Bouza Santiago, Profesor-Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General "Gregorio Marañón" y Profesor Asociado de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "Resistencia a antibióticos Beta lactámicos en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*" realizado por D. Jesús Martínez Beltrán, Licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense, se ha llevado a cabo bajo mi dirección y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor en Farmacia.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Una firma manuscrita en tinta, que parece ser la del Prof. Emilio Bouza Santiago, con una gran 'B' inicial y una línea horizontal extendida.

Prof. Emilio Bouza Santiago

Madrid 28 de Septiembre de 1992.

A la memoria inolvidable de mi padre, y a mi madre.

Al recuerdo entrañable de Manuel Moreno López.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la Tesis Doctoral, y al cumplirse veinte años de ejercicio profesional de la Microbiología Clínica, me gustaría expresar mi profunda gratitud, no sólo a quienes han hecho posible este trabajo, sino también a quienes han contribuido a mi formación en todas sus facetas.

Gratitud a mi familia. A la familia excepcional en la que tuve la inmensa fortuna de nacer y de vivir: mis padres, mis hermanos y su gente. A la familia que con suerte, y tal vez con algo de acierto por mi parte, hemos formado Cristina, David y Cristina. Siempre sentí su apoyo, siempre estuvieron "al quite".

Gratitud, y emocionado recuerdo, a mis profesores de Ciencias Naturales, D. Antonio Gómez Chico; de Biología, D^a Amparo Gaya Nuño; y de Microbiología, D. Lorenzo Vilas López. Con su amabilidad y conocimientos me interesaron en las Ciencias de la Vida.

Gratitud, al Servicio de Microbiología de la Clínica Puerta de Hierro. Su creador, el Dr. Manuel Moreno López, hombre bueno y verdadero pionero de la Microbiología Clínica de nuestro país; su actual responsable, el Dr. Diego Dámaso, me iniciaron en el "mundo de los antibióticos".

Gratitud y afecto, al Dr. Fernando Baquero, Jefe del Servicio de Microbiología de nuestro Hospital Ramón y Cajal. Me brindó la oportunidad de formar parte de su Servicio y ha contribuido decisivamente en mi formación, aunque a veces de manera por mi inexcusable. Su inteligente y futurista enfoque de la relación microorganismos-antibióticos está plasmada en el argumento central de este trabajo.

Gratitud y afecto, a quienes han hecho posible esa modesta realidad del Laboratorio de Antibióticos de nuestro Servicio. A la Dr^a Elena Loza por su permanente disposición, cariño y ayuda; al Dr. Rafael Cantón que ha contribuido con enorme generosidad a la realización de este trabajo; al Dr. Luis de Rafael; a Felisa Almaraz, Francisco Soriano y Montserrat Gallego, cuya contribución ha ido mucho más lejos del mero trabajo técnico. A todos los residentes y "adeptos" a nuestro laboratorio. Tratando de enseñarles algo, aprendí mucho.

Gratitud a todos los excelentes médicos de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, de la que siempre me sentí un integrante más. Los Drs. Luis Buzón, Antonio Guerrero, Marta Rodríguez Creixems, Fernando Martínez-Luengas, José Sanz Hospital, José Romero, Francisco Parras, Santiago Moreno, apreciaron siempre mi trabajo y me hicieron patente su amistad.

Gratitud al Dr. Antone Medeiros, del Miriam Hospital, Brown University (RI). A su entusiasmo y posibilismo debo mi predilección por el "mundo de las betalactamasas". La generosidad de la familia Medeiros hizo gratísima mi estancia en EE.UU.

Mi gratitud a los Drs. José Subirón, Angeles Torrellas y José Luis de la Vega, y a la corporación SB Pharmaceuticals de España. Su estrecha y desinteresada colaboración ha hecho posible este y otros muchos trabajos. También he de agradecer la magnífica colaboración de los Drs. José Luis Carrasco y Rosario López en las tareas estadísticas, en las que mi ignorancia alcanza grados supinos.

Gratitud al Profesor Cesar Nombela, Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y ponente de esta Tesis. Su permanente predisposición, su paciencia y sus consejos, los estimo en lo mucho que valen.

Mi gratitud, al Dr. Emilio Bouza, Director de esta Tesis y antes que todo amigo entrañable. Persona excepcional en todos los aspectos: humano, profesional y científico. Siempre he apreciado su dedicación a mi formación como microbiólogo y "aficionado a las Enfermedades Infecciosas". Con haber sido definitiva, siempre estimaré muchísimo más su profundo sentido de la amistad.

Madrid, Septiembre de 1992.

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCION

1. A modo de introducción y objetivos	1
2. Aproximación al concepto de resistencia a los antimicrobianos	4
2.1 Resistencia genotípica	7
2.2 Resistencia fenotípica	12
2.3 Resistencia clínica	26
3. Antibióticos betalactámicos: Desarrollo y perspectiva histórica	29
3.1 Penicilinas	30
3.2 Cefalosporinas y cefamicinas	34
3.3 Monobactams, inhibidores de betalactamasa y carbapenems	40
4. Membrana externa y resistencia a antibióticos betalactámicos	44
4.1 Estructura de la membrana externa	44
4.1.1 Doble capa lipídica	45
4.1.2 Porinas	46
4.1.3 Vías específicas alternativas	47
4.2 Permeabilidad de la membrana externa	47
4.2.1 Factores relativos a la permeabilidad	47
4.2.2 Efecto de barrera y eficacia antimicrobiana ...	49
4.2.3 Estimación cuantitativa del efecto de barrera .	50
4.2.4 Permeabilidad en bacilos gram-negativos	53
4.3 Resistencia y permeabilidad de la membrana externa.	55
4.3.1 Resistencia intrínseca	55
4.3.2 Mutaciones que afectan a la doble capa lipídica	56
4.3.3 Mutantes deficientes en porinas	56
4.3.4 Mutantes pleiotrópicos	58
4.3.5 Mutantes de vías específicas	59
5. PBPs y resistencia a antibióticos betalactámicos	60
5.1 Aspectos esenciales	60

5.2	Pared celular y mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos	62
5.3	Características y funciones de las PBPs	65
5.4	PBPs de bacterias gram-negativas	70
5.5	Implicaciones de las PBPs en la resistencia	71
5.6	PBPs y resistencia en <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>P. aeruginosa</i>	75
6.	Betalactamasas y resistencia a antibióticos betalactámicos	77
6.1	Introducción y perspectiva histórica	77
6.2	Características generales de las betalactamasas ...	81
6.3	Detección y ensayo de betalactamasas	86
6.4	Caracterización de betalactamasas	88
6.5	Clasificación de betalactamasas	96
6.6	Betalactamasas plasmídicas de gram-negativos	110
6.6.1	Betalactamasas plasmídicas clásicas	115
6.6.1.1	Betalactamasas de amplio espectro	115
6.6.1.2	Oxacilinasas	118
6.6.1.3	Carbenicilinasas	120
6.6.1.4	Cefalosporinasas	124
6.6.2	Betalactamasas plasmídicas clásicas: Resistencia y repercusión clínica	124
6.6.3	Betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado	131
6.6.3.1	Aminotiazol-oxiimino betalactamasas	134
6.6.3.2	Cefamicinasas	136
6.6.3.3	Carbapenemasa	138
6.6.4	Betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado: Resistencia y repercusión clínica	140
6.7	Betalactamasas cromosómicas de gram-negativos	142
6.7.1	Características generales	143
6.7.2	Expresión genética y mecanismos de resistencia	148
6.7.3	Cefalosporinasas constitutivas	154
6.7.4	Cefalosporinasas inducibles	155
6.7.5	Oxiiminocefalosporinasas	158
6.7.6	Penicilinasas	159
6.7.7	Metaloenzimas	159
6.7.8	De amplio espectro en <i>Klebsiella</i>	159
6.7.9	Betalactamasas cromosómicas: Resistencia y repercusión clínica	160

II MATERIAL Y METODOS

1. Microorganismos	167
2. Antimicrobianos	169
3. Estudios de sensibilidad a antibióticos betalactámicos.	170
3.1 Método de difusión con disco	170
3.2 Método de dilución en agar	170
4. Estimación matemática de los puntos críticos de sensi- bilidad y resistencia a antibióticos betalactámicos ...	174
5. Diferenciación de fenotipos de resistencia a antibióti- cos betalactámicos	177
6. Evolución temporal de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	178
7. Caracterización de betalactamasas	179
7.1 Obtención del extracto crudo enzimático	179
7.2 Isoelectroenfoque (IEE)	180
8. Determinación de la actividad betalactamasa	182
8.1 Determinación espectrofotométrica	182
8.2 Ensayo microbiológico	184

III RESULTADOS

1. Estructura del apartado	185
2. Escherichia coli	187
2.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	187
2.2 Distribución de aislamientos para cada concentra- ción de antimicrobiano	191
2.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a an- tibióticos betalactámicos	193
2.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	193

2.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta-lactámicos	193
2.6	Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa TEM-1	194
2.7	Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa OXA-1	195
2.8	Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa cromosómica	196
2.9	Patrón diferencial de sensibilidad de los fenotipos productores de betalactamasas cromosómica, OXA-1 y TEM-1	198
2.10	Efecto inóculo en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasas cromosómica, OXA-1 y TEM-1	198
3.	Salmonella spp.	201
3.1	% acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	201
3.2	Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano	205
3.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	207
3.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	207
3.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta-lactámicos	207
4.	Shigella spp.	208
4.1	% acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	208
4.2	Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano	212
4.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	214
4.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	214
4.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta-lactámicos	214

5. <i>Proteus mirabilis</i>	215
5.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	215
5.2 Distribución de aislamientos para cada concentra- ción de antimicrobiano	219
5.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a an- tibióticos betalactámicos	221
5.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	221
5.5 Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta- lactámicos	221
6. <i>Klebsiella spp.</i>	222
6.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	222
6.2 Distribución de aislamientos para cada concentra- ción de antimicrobiano	226
6.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a an- tibióticos betalactámicos	228
6.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	228
6.5 Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta- lactámicos	228
7. <i>Yersinia enterocolitica</i>	229
7.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	229
7.2 Distribución de aislamientos para cada concentra- ción de antimicrobiano	232
7.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a an- tibióticos betalactámicos	234
7.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	234
7.5 Evolución de la sensibilidad a antibióticos beta- lactámicos	234
8. <i>Proteus vulgaris</i>	235
8.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	235
8.2 Distribución de aislamientos para cada concentra- ción de antimicrobiano	239

8.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	241
8.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	241
8.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	241
9.	Enterobacter spp.	242
9.1	% acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	242
9.2	Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano	246
9.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	248
9.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	248
9.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	248
10.	Citrobacter freundii	249
10.1	% acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	249
10.2	Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano	253
10.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	255
10.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	255
10.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	255
11.	Morganella morganii	256
11.1	% acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	256
11.2	Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano	260
11.3	Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	262
11.4	Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos	262
11.5	Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos	262

12. <i>Serratia marcescens</i>	263
12.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	263
12.2 Distribución de aislamientos para cada concen- tración de antimicrobiano	267
12.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	269
12.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clíni- ca a antibióticos betalactámicos	269
12.5 Evolución de la sensibilidad a antibióticos be- talactámicos	269
13. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	270
13.1 % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas	270
13.2 Distribución de aislamientos para cada concen- tración de antimicrobiano	272
13.3 Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos	273
13.4 Fenotipos de resistencia microbiológica y clíni- ca a antibióticos betalactámicos	273
13.5 Evolución de la sensibilidad a antibióticos be- talactámicos	273

IV DISCUSION

1. <i>Escherichia coli</i> y antibióticos betalactámicos	274
2. <i>Salmonella spp.</i> y antibióticos betalactámicos	284
3. <i>Shigella spp.</i> y antibióticos betalactámicos	287
4. <i>Proteus mirabilis</i> y antibióticos betalactámicos	290
5. <i>Klebsiella spp.</i> y antibióticos betalactámicos	293
6. <i>Yersinia enterocolitica</i> y antibióticos betalactámicos.	297
7. <i>Proteus vulgaris</i> y antibióticos betalactámicos	299
8. <i>Enterobacter spp.</i> y antibióticos betalactámicos	303
9. <i>Citrobacter freundii</i> y antibióticos betalactámicos ...	308
10. <i>Morganella morganii</i> y antibióticos betalactámicos	310
11. <i>Serratia marcescens</i> y antibióticos betalactámicos	314
12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y antibióticos betalactámicos .	317

<u>V CONCLUSIONES</u>	322
------------------------------------	------------

<u>VI BIBLIOGRAFIA</u>	327
-------------------------------------	------------

I.- INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1. A MODO DE INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Los antibióticos betalactámicos configuran el grupo de antimicrobianos más extenso y prolífico de cuantos integran hoy el arsenal terapéutico frente a la infección bacteriana. Las betalactamasas, enzimas que hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico inactivan los antibióticos betalactámicos, constituyen el mecanismo de resistencia más difundido entre la población bacteriana, y el que, sin duda, más ha hecho progresar la antibioterapia. La interrelación antibióticos betalactámicos-betalactamasas es el substrato de una "historia interminable" de la que hoy sólo conocemos algunos capítulos.

Sir Alexander Fleming¹ en 1929 no sólo se limita a revelar la existencia de una sustancia con actividad antibacteriana sintetizada por un hongo del género **Penicillium**. También pone de manifiesto la resistencia antimicrobiana al descubrir que algunas bacterias del grupo "coli-tifoidea" no son inhibidas por la penicilina. El mismo autor, algunos años después (1946), en una conferencia pronunciada ante el "staff" de la Clínica Mayo en Rochester (EE.UU), establece los principios básicos de la relación antibióticos-microorganismos que van a prevalecer en adelante. Manifiesta literalmente " If you use penicillin against microbes, and if you use it carefully enough to get the penicillin at the microbe, you will get good results. If you use it against insensitive microbes or if you are very casual in your treatment, so that the penicillin never properly reaches the microbes, you will have disappointments". De esta manera, tan aparentemente elemental, quedan implícitamente desvelados aspectos fundamentales de la quimioterapia antibacteriana. Inicialmente, las referencias encontradas en la literatura científica sólo se refieren a "inhibición o no inhibición". Progresivamente el concepto sensibilidad-resistencia va adquiriendo perspectivas más definitorias, y por supuesto más complejas y atractivas.

Muy recientemente, ASM News Julio de 1992, P. Courvalin² hace pública la que consideramos idea más de progreso acerca del concepto de resistencia: "Interpretive Reading of Antimicrobial Susceptibility Testing". Estima periclitada la lectura e inter-

pretación de las pruebas de sensibilidad "in vitro" referidas a una sola especie antimicrobiana y un antibiótico puntual o concreto. Afirma rotundamente que la interpretación del antibiograma debe hacerse considerando familias de antibióticos y poblaciones bacterianas diferentes de una misma especie. Así, sólo de la diferenciación de fenotipos de sensibilidad-resistencia se podrán extraer las conclusiones oportunas para profundizar en el concepto de resistencia a los antimicrobianos. En síntesis, la inteligente proposición de este autor descansa en: a) la caracterización de fenotipos de resistencia en función de un grupo amplio de antibióticos de una misma familia; b) la deducción a partir de los fenotipos, de los mecanismos de resistencia; c) la inferencia a expensas de los mecanismos de resistencia deducidos, de los fenotipos previamente establecidos.

La utilización indiscriminada, y por tanto irracional, de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, y de otras muchas que no lo son, ha sido motivo de preocupación en los más diversos foros científicos. Su denuncia y el análisis de sus consecuencias han generado un elevado número de publicaciones. En nuestro país, el grupo de la Clínica Puerta de Hierro dirigido por el Moreno López, fueron pioneros en el estudio de las consecuencias microbiológicas, económicas e incluso de matiz social, que tal "uso y abuso" acarrea³. Las implicaciones que en el desarrollo de resistencia "in vitro" e "in vivo" tiene tal proceder son bastante conocidas, aunque ciertos aspectos están, todavía, por determinar.

La profundización en alguna de estas consideraciones; la relevancia que en la infección hospitalaria tienen **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa**; la importancia, y también cierta preferencia personal por los antibióticos betalactámicos y las betalactamasas como mecanismo de resistencia; y la experiencia adquirida sobre todo ello durante los últimos 15 años en el Hospital Ramón y Cajal, han sido determinantes en la elección del tema "Resistencia a los antibióticos betalactámicos en **Enterobacteriaceae** y **Pseudomonas aeruginosa**" como proyecto de Tesis Doctoral. Hemos enfocado nuestro trabajo desde dos perspectivas distintas pero relacionadas.

En la primera, más académica, reflexionamos acerca del concepto sensibilidad-resistencia a los antimicrobianos, haciendo hincapié en la diferenciación conceptual y práctica sobre resisten-

cia microbiológica y resistencia clínica. Además, hemos revisado extensamente los tres mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos, con particular énfasis en la resistencia mediada por las betalactamasas como mecanismo de mayor trascendencia. Ambos epígrafes constituyen, y espero justifiquen, la inusual extensión de la introducción.

En la segunda, experimental, recogemos nuestra experiencia de 10 años sobre la resistencia de **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa** a penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación, y aztreonam. Tomando como modelo **Escherichia coli**, estudiamos la resistencia mediada por betalactamasas y su participación en los distintos patrones de sensibilidad-resistencia a los antibióticos betalactámicos. Creemos que nuestra serie, constituye la experiencia más amplia de las obtenidas en nuestro país, y una de las más extensas de la literatura mundial. En nuestro trabajo nos fijamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de la resistencia cuantitativa de 25.567 microorganismos gram-negativos a 9 antibióticos betalactámicos y diferenciación de las distintas poblaciones bacterianas pertenecientes a cada especie, mediante la aplicación de un modelo matemático.
- 2) Determinación de los criterios de sensibilidad-resistencia a los antibióticos betalactámicos en **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa**, mediante la especificación de los puntos críticos de sensibilidad y resistencia microbiológica, PCSM y PCRM, obtenidos tras la aplicación del modelo matemático anterior. Comparación de estos criterios con los emitidos por los comités internacionales para el estudio de la resistencia.
- 3) Diferenciación, para cada especie, de los fenotipos de resistencia microbiológica y clínica, a expensas del PCRM y del punto crítico farmacocinético (PCF), respectivamente.
- 4) Estudio de la participación de las betalactamasas cromosómicas, TEM-1 y OXA-1, y su nivel de producción, en los fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos en **E. coli**
- 5) Análisis estadístico de la evolución de la sensibilidad en el periodo 1977-1986.

2. APROXIMACION AL CONCEPTO DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

La propiedad sustantiva de los antimicrobianos radica en su actividad contraproducente, bacteriostática o bactericida, para los microorganismos patógenos o comensales, susceptibles de causar patología infecciosa. No parece sorprendente, en consecuencia, el acostumbramiento microbiano a coexistir con los antibióticos, bien de una manera pasiva sometidos a su acción letal, y hablaríamos de sensibilidad, bien mediante una contestación efectiva oponiéndose a su efecto, y hablaríamos de resistencia o falta de respuesta. Ambos conceptos van biunívocamente unidos y han de ser analizados al unísono.

La convivencia de las bacterias con los antimicrobianos no es ni casual, ni reciente. El origen natural microbiano de muchos antibióticos enfatiza su proximidad real hasta tal punto que la producción de antimicrobianos podría considerarse como un requisito fisiológico, y la resistencia como la necesidad de un mecanismo protector en organismos produciendo antibióticos. De diferentes plantas coleccionadas en el siglo XVII se han obtenido esporas de *B. subtilis* productor de penicilinas⁴. En un cultivo de *E. coli* almacenado previamente, se ha encontrado un plásmido de resistencia a estreptomycin y tetraciclina, antibióticos descubiertos con posterioridad⁵. En cepas de *Streptomyces* productoras de aminoglicósidos se han individualizado enzimas modificantes que muestran homología con las caracterizadas, posteriormente, en diversas bacterias gram-negativas resistentes a los aminoglicósidos⁶. La presencia de plásmidos no parece un fenómeno actual, toda vez que en bacterias gram-negativas preservadas desde la era preantibiótica se ha podido demostrar la presencia de plásmidos, similares a los actuales de resistencia, aunque carentes de los determinantes específicos de la misma⁷. Parece, por tanto, que los antibióticos, como productos naturales, se acumulan en algunos ambientes en cantidad suficiente como para actuar como agentes selectivos. No obstante, la existencia de bacterias resistentes en la era previa al uso clínico de los antimicrobianos debía ser extraordinariamente infrecuente. La resistencia tal como hoy la entendemos, y sobre todo en sus dimensiones actuales, parece un hecho multifactorial en el que además de factores genéticos, han con-

contribuido otros estrechamente asociados con el empleo abusivo de antimicrobianos.

La noción moderna de resistencia, como un fenómeno natural e intrínseco, parte de la observación de Fleming sobre la ineffectividad de la penicilina frente a bacterias gram-negativas, esencialmente bacterias entéricas¹. La primera constatación de la resistencia adquirida como respuesta bacteriana a la agresión antibiótica, la realiza Kirby al relacionar la falta de respuesta de *S. aureus* a penicilina con la codificación de un mecanismo de resistencia, producción de penicilinasas, del que inicialmente carecían⁸. A partir de entonces, es un hecho repetidamente comprobado que la introducción de un fármaco antimicrobiano en la práctica clínica se sigue de la aparición de cepas resistentes al mismo, distintas de las que lo eran inicialmente de manera natural. En este sentido se puede afirmar que todos los antimicrobianos tienen su faceta negativa en la existencia de varios mecanismos de resistencia bacteriana que limitan su eficacia y empleo. A mayor abundamiento, hasta las bacterias más naturalmente sensibles a los antimicrobianos, disponen ahora de mecanismos variados y complejos que les permiten sobrevivir, a veces muy holgadamente, en ambientes desfavorables por la presencia y presión selectiva de los antimicrobianos. La resistencia, por tanto, es un fenómeno con múltiples implicaciones biológicas, terapéuticas, clínicas, sociológicas y económicas. Como hecho puntual es más o menos mensurable por estas implicaciones; como concepto no es tan fácil de definir y ha dado lugar a interpretaciones confusas y propensas al error.

Conceptualmente, el binomio sensibilidad/resistencia es básicamente microbiológico. Por sensibilidad se entiende la respuesta favorable, inhibitoria o letal, de una bacteria a la acción de un antibiótico. En sentido opuesto, por resistencia se entiende la ausencia de respuesta a la acción antimicrobiana. Ambos términos, con frecuencia usados para describir fenómenos similares, necesitan precisiones o matices posteriores que contemplen todas las vertientes. En principio, no pueden concebirse de manera absoluta siendo preciso un ejercicio de relativización hacia valores mensurables. Nace, así, la sensibilidad/resistencia "in vitro", como un fenómeno medible en el laboratorio bajo unas condiciones estandarizadas que, cada vez más, buscan y dependen a la reproducibilidad. En síntesis, desde un punto de

vista estricto "in vitro", resistencia a una determinada concentrada concentración de antimicrobiano sólo expresa la habilidad de un microorganismo para multiplicarse en presencia de esa concentración, bajo condiciones bien definidas y estandarizadas; sensibilidad, esencialmente, es lo opuesto, y bajo este criterio es el fenómeno contrario⁹.

La resistencia así expresada no hace sino reconocer fenotípicamente lo que implícitamente marcan los caracteres genotípicos de los microorganismos. El hecho de que una bacteria se muestre "in vitro" como resistente, sobre todo a elevadas concentraciones de un antimicrobiano, pone de manifiesto la presencia de un mecanismo de resistencia codificado por genes contenidos en el ADN bacteriano. Debemos diferenciar, por tanto, entre resistencia fenotípica y resistencia genotípica. Es este un punto crucial que abre la puerta a la reflexión sobre lo que en términos absolutos se conoce como sensibilidad o resistencia. En otras palabras, deberíamos matizar si la presencia de un mecanismo genético que confiere cierto grado de resistencia es suficiente para tildar a una bacteria como resistente. El reconocimiento en el laboratorio, por técnicas fiables y sencillas, de la existencia de un mecanismo genético de resistencia, nos va a permitir avanzar significativamente en la aproximación que pretendemos al concepto del binomio sensibilidad/resistencia. En este sentido las directrices más actuales van, no tanto por la identificación de bacterias fenotípicamente sensibles, como por la caracterización de la resistencia genotípica¹⁰.

Finalmente, existe una última vertiente de aproximación al problema que hace referencia al concepto clínico-terapéutico de lo que se entiende por sensibilidad o resistencia¹¹. Desde un punto de vista exclusivamente teórico las acepciones sensible y resistente pueden aplicarse a un microorganismo bajo condiciones "in vivo". Así, diríamos que un microorganismo es sensible si de la acción del antimicrobiano se sigue su erradicación del lugar de la infección; en caso opuesto afirmaríamos que el microorganismo es resistente. De nuevo, bajo un prisma clínico estamos considerando respuesta microbiológica. Por tanto la sensibilidad o resistencia desde una perspectiva clínica, que exige presencia o ausencia de respuesta clínica, es una entelequia en la que influyen múltiples factores del microorganismo, del antibiótico, y sobre todo del paciente, de las que depende el éxito o fracaso terapéutico.

En el pasado, y también en la actualidad, se ha pretendido una correspondencia casi matemática entre sensibilidad/resistencia "in vitro" y respuesta clínica, sin tener en cuenta la imposibilidad de "trasladar" al laboratorio el cúmulo de circunstancias, tan variables y personales, que se dan en cada infección en cada paciente. De ahí que muchas veces se haya constatado la ausencia de correlación entre los datos generados en el laboratorio y la respuesta clínica. En nuestro criterio, los resultados "in vitro" sobre la sensibilidad/resistencia de una bacteria a un antimicrobiano sólo indican, a modo de orientación, la conveniencia o el rechazo a utilizar ese antimicrobiano en la clínica. Los factores farmacocinéticos del antimicrobiano, la localización y características de la infección, el estado patofisiológico del paciente, y la experiencia en el tratamiento de procesos similares, son parámetros a considerar una vez que se conoce la respuesta al antimicrobiano en condiciones "in vitro".

En síntesis, la aproximación más fidedigna al concepto de sensibilidad/resistencia pasa, necesariamente, por la consideración de perspectivas genotípicas relacionadas con los mecanismos de resistencia; fenotípicas, como expresión reconocible en el laboratorio de las anteriores; y clínicas, en las que no sólo se evalúe al microorganismo y al antibiótico, sino las características del paciente y de la infección que en él asienta.

2.1 RESISTENCIA GENOTÍPICA.

La aproximación genética al concepto de sensibilidad/resistencia descansa, exclusivamente, en la ausencia o presencia en el material genético de la bacteria de uno o varios determinantes de resistencia. Que la existencia de un gen que codifique un determinado mecanismo de resistencia, de lugar a resistencia fenotípica de bajo o alto nivel, o más aún, ocasione resistencia clínica, son posibilidades de ulterior consideración. En cualquier caso, para un microorganismo la sólo eventualidad de disponer de un mecanismo de resistencia potencia la verosimilitud de la resistencia clínica y el fracaso terapéutico. Parece, pues, incuestionable la conveniencia de disponer de técnicas rápidas y fiables que hagan posible la detección y la caracterización de la resistencia a nivel genotípico¹⁰.

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos puede tener su origen más inmediato en la necesidad de sistemas protectores para organismos que producen antibióticos. Sin embargo, y en sentido más amplio, puede considerarse como una consecuencia más de la evolución microbiana para la que es esencial la variabilidad genética¹². A ella puede llegarse a través de cambios microevolutivos, relacionados con mutaciones puntuales en un par de bases de un nucleótido que modifiquen la diana del antibiótico interfiriendo con su actividad, o a expensas de alteraciones macroevolutivas originadas por "traslados" de secuencias de ADN de un lugar a otro del cromosoma, y que incluyen: inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposiciones¹³. Generalmente, estas últimas son vehiculadas por elementos genéticos especializados conocidos como transposones o secuencias de inversión, que tienen gran maniobrabilidad en el cromosoma, o entre el cromosoma y otros replicones. Además, y de forma sustantiva, a la variabilidad genética y a la evolución del mundo microbiano, han contribuido la posibilidad de adquirir material genético del exterior a expensas de plásmidos, bacteriófagos o elementos de transposición¹⁴. El patrimonio genético de estos elementos extracromosómicos ha dotado a las bacterias de "poderosos argumentos" para hacer frente a los antimicrobianos.

Una vez que un gen de resistencia emerge, las posibilidades de diseminación de la resistencia son muy variadas¹². El modelo más simple contempla la diseminación clonal de una bacteria a su progenie, de los determinantes de resistencia contenidos en el cromosoma, plásmidos o transposones. La facultad de estos últimos de extender la resistencia entre distintos fragmentos de ADN: cromosoma, plásmidos y bacteriófagos, incrementa las posibilidades de los genes de resistencia. La integración estable de un transposón en el cromosoma facilita la diseminación clonal de factores de resistencia. La propagación horizontal de la resistencia entre bacterias próximas se hace, aunque no de modo exclusivo, por medio de ADN plasmídico y a expensas de mecanismos de conjugación, transducción, transposición y transformación. Así, clones de bacterias resistentes pueden proliferar en la flora de pacientes expuestos a los antimicrobianos, permitiendo un posterior fenómeno de selección y "depuración" de la resistencia. Por alguno de estos procedimientos, o más usualmente, por la yuxtaposición de varios, las bacterias han desarrollado resistencia a todos los antimicrobianos¹².

La capacidad potencial de las bacterias, en cuanto a la emergencia de la resistencia, es prácticamente ilimitada. Antes o después, cualquier microorganismo es capaz de desarrollar resistencia a cualquier antimicrobiano, y más si se encuentra entre los fármacos de elección en el ámbito clínico. Excelentes ejemplos son los ofrecidos por *S. aureus*, con resistencia progresiva en el tiempo a penicilinas, meticilina y resto de ABL, aminoglicósidos, macrólidos, lincosamidas y quinolonas; *E. faecalis* con resistencia a penicilinas, aminoglicósidos y vancomicina; o *Enterobacteriaceae* multirresistentes. Con todo, no debemos tener la sensación de una enorme diversidad de mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de la resistencia, sino más bien la sensación de que son limitados en el número, aunque eficaces y muy compartidos^{12,15}.

Generalmente, y como no podría ser de otra forma, los diferentes mecanismos bioquímicos de resistencia alcanzan a todas las posibilidades de interrelación de los microorganismos con los antibióticos^{12,15}. Así, están bien caracterizados mecanismos que atañen a la entrada del antibiótico en la bacteria y a la permeabilidad de las membranas externa y citoplásmica; mecanismos de destoxificación enzimática del antibiótico a expensas de enzimas hidrolizantes, modificantes o sustitutivos, de cuya acción se sigue la inactivación y la ineficacia del antibiótico; y mecanismos que suponen modificaciones en la diana, ribosómica o enzimática, que impiden el reconocimiento del antimicrobiano evitando su acción. Por otra parte, la responsabilidad genética también es limitada, y en muchas ocasiones multifactorial, de forma que los diferentes mecanismos bioquímicos pueden ser codificados por el cromosoma, o por plásmidos y transposones, o por dos o más de ellos a la vez.

La aproximación genotípica a la resistencia considera el caudal de conocimientos, a niveles bioquímico y genético, acumulados en los últimos 20 años en cuanto a los mecanismos de acción y resistencia. La detección de la resistencia a nivel genético asume que la codificación de un mecanismo concreto confiere resistencia, independientemente de la bacteria (huesped procariótico), del paciente (huesped eucariótico) y del sistema de detección¹⁰. La resistencia genotípica, en suma, contesta afirmativa o negativamente, a la presencia de genes de resistencia, no permitiendo las categorías intermedias o indeterminadas de

otros sistemas. Además, la resistencia genotípica debida a la adquisición de ADN exógeno, se correlaciona bastante bien con la expresión fenotípica de alto nivel, y en general con la resistencia clínica¹⁶.

El análisis genético de la resistencia a antibióticos, bien puntual en cuanto a un marcador concreto, bien más amplio en cuanto a la distribución de genes de resistencia, es cada vez más factible merced a la dilucidación del mecanismo bioquímico de la mayoría de los marcadores de resistencia, y al desarrollo de tecnología a nivel molecular que incluye técnicas de clonación, hibridación de ADN, secuenciación de nucleótidos y proteínas, y análisis con enzimas de restricción de plásmidos y cromosoma. Sin embargo, para la detección fiable de genes de resistencia se utilizan con mayor asiduidad la hibridación de ADN¹⁷ y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁸⁻²⁰. En la primera, se utilizan sondas construidas sobre fragmentos de genes clonados, intragénicos para ser específicos, y oligonucleótidos específicos de un marcador o universales capaces de detectar genes que codifican isoenzimas. En la PCR, se emplean primeros complementarios de regiones conservadas de genes de resistencia, de manera que se obvia la heterogeneidad de los genes y la hibridación no específica, factores muy limitantes en la detección de genes de resistencia. Sin duda, queda algún camino por recorrer hasta la utilización diaria o rutinaria de ambas técnicas. Su aplicación dependerá, en buena medida, de la rapidez de resultados y de la disminución de los costes que pueda conllevar la automatización, toda vez que su conveniencia está fuera de dudas al poderse aplicar directamente a muestras clínicas, sobre todo si contienen un solo tipo de microorganismo.

Por el momento, un serie de limitaciones, independientes de las meramente técnicas o económicas, pueden coartar la generalización de estos procedimientos¹⁰. La denominada resistencia intrínseca, pobremente conocida, generalmente relacionada con la ausencia de dianas específicas o con la impermeabilidad, impide la determinación de genes de resistencia. La existencia de mutaciones en múltiples locus estructurales o reguladores, no favorece la aproximación a la resistencia a nivel molecular. Además, ciertos determinantes de resistencia en patógenos humanos han escapado a la detección habitual, aunque la hibridación con

ácidos nucleicos reduciría el número de genes desconocidos, y la ampliación de genes pertenecientes a diferentes clases que permite la PCR haría más viable la identificación de determinantes no caracterizados. Un problema adicional lo ocasionarían los genes silentes o pseudogenes, cuya incidencia en la naturaleza es desconocida, ya que al no ser expresados fenotípicamente darían lugar a falsos positivos.

Las ventajas del análisis genotípico de la resistencia no son en absoluto desdeñables y en conjunto superan ampliamente a las posibles limitaciones¹⁰. La tecnología a nivel molecular consigue el análisis clonal con rapidez y con una sensibilidad que permite su ajuste. La PCR facilita simultáneamente la identificación y la sensibilidad antimicrobiana de una célula no viable, haciendo posible la exploración del genoma de una bacteria tal y como está en la muestra. De esta forma se evitan variaciones en la resistencia, por mutaciones adicionales o por curación y pérdida de plásmidos. La sensibilidad ajustable de la PCR y sus posibilidades de cuantificación, permiten controlar el nivel de detección modificando las condiciones de la reacción y el número de ciclos. Además, al no precisar del crecimiento bacteriano, el tiempo requerido para la detección genotípica puede acortarse hasta 4 horas.

En la detección fenotípica de la resistencia se presentan dificultades inherentes a la expresión, que en su mayor parte son soslayadas por los estudios del genoma bacteriano. En ocasiones, promotores genéticos débiles, como los de las nuevas *Bla*s tipo TEM, ofrecen niveles de resistencia bajos cuyo reconocimiento escapa a los tests habituales. La detección de los genes de resistencia ignora esta dificultad, y así, una sonda TEM universal, una colección de sondas de oligonucleótidos, o la técnica de la PCR utilizando una amplificación de primeros adecuada, puede detectar no sólo el gen sino cuantificar el enzima, aún cuando esten presentes dos isoenzimas en la misma célula²¹. Por otra parte, existen mecanismos de resistencia ocultos o de difícil identificación, que son detectados con mayor fiabilidad con el concurso de técnicas de biología molecular. La resistencia de bajo nivel a glicopéptidos en *Enterococcus*, y la presencia de enzimas modificantes de aminoglicósidos que no se expresan en el fenotipo, esencialmente en bacterias gram-positivas, son excelentes prototipos de la utilidad del análisis genotípico²².

En resumen, es evidente que se ha abierto un nuevo campo con excelente futuro en la caracterización y cuantificación de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Aunque estos métodos no constituyen una contestación universal y concluyente a la definición de la resistencia, basada en parámetros que consideran más la sensibilidad, si que se evitarían tratamientos inadecuados al detectarse resistencia. De valor adicional sería la estandarización internacional de criterios de resistencia, el descubrimiento de nuevos mecanismos, la mejor evaluación de nuevos antimicrobianos, e incluso el diseño de nuevos conceptos en microbiología clínica al considerar a las bacterias como entes individuales, en vez de analizar poblaciones integradas por progenies sucesivas.

2.2 RESISTENCIA FENOTÍPICA.

Por fenotipo se entiende, en acepción vertida por la Real Academia de la Lengua Española, el conjunto de caracteres hereditarios cuya aparición es debida a la existencia de genes que posee cada individuo perteneciente a una determinada especie vegetal o animal. En síntesis, el fenotipo es la expresión reconocible del genotipo, y en consecuencia la resistencia fenotípica, y la sensibilidad fenotípica, son la expresión reconocible de la presencia o ausencia de marcadores de resistencia a antimicrobianos, codificados por el genoma de cada microorganismo. Parece evidente, por tanto, que la esencia fenotípica está en su capacidad de ser reconocida, y a este fin se han diseñado muy diferentes ardides técnicos, conocidos como métodos de determinación de la sensibilidad/resistencia "in vitro".

Estas técnicas tienen como objetivo primario la puesta de manifiesto, cualitativa o cuantitativa, de cualquier mecanismo bioquímico o estructural de resistencia a los antibióticos, y como fin adicional, pero evidentemente trascendente, ser la guía básica en la elección del antimicrobiano adecuado para cada paciente, en función del microorganismo causante de la infección y de su sensibilidad. Por tanto, y desde un punto de vista terapéutico, los tests de sensibilidad constituyen el primer paso a dar en el complejo y multifactorial proceso de elección de un antimicrobiano. Ambos objetivos han de ser compatibles y requieren, inicialmente, de la distinción entre sensibilidad y resis-

tencia desde perspectivas "in vitro", y su relativización posterior a aspectos clínicos o "in vivo".

La posibilidad de un microorganismo de multiplicarse o no hacerlo en presencia de una determinada concentración de antibiótico, bajo condiciones "in vitro" bien especificadas, define en sentido amplio los términos de resistencia y sensibilidad. Por lo tanto, las denominaciones sensible y resistente deberían, en principio, limitarse a la cualificación de un microorganismo bajo condiciones "in vitro". Bajo este prisma, el problema más acuciante radica en la elección, para cada antibiótico, de la concentración discriminatoria de sensibilidad y resistencia, o lo que es lo mismo, la concentración que permite "intuir" a expensas de un valor cuantitativo, la presencia o ausencia de un mecanismo genético de resistencia. Sin duda, esa concentración, o a veces ese pequeño intervalo de concentraciones, debería facilitarnos la tarea de diferenciar las cepas que pertenecen a la población sensible de aquellas que, codificando un mecanismo de resistencia, pertenecen a la población resistente. En este sentido, un microorganismo sería sensible si su crecimiento es inhibido por una concentración de antibiótico que inhibe la mayoría de las cepas de la misma especie, y resistente en el caso opuesto. Sensible, en consecuencia, significa pertenecer a la población sensible de la misma especie, carente de mecanismos de resistencia; resistente significaría "menos susceptible" que, o perteneciente a otra población diferente, provista de mecanismos de resistencia.

La resistencia bacteriana es secundaria a mutaciones o a la adquisición de ADN exógeno, y se refiere siempre de forma relativa a la cepa progenitora considerada como sensible. Aunque no todos los mecanismos de resistencia a los antibióticos son conocidos, la reciente elucidación de muchos mecanismos bioquímicos y genéticos de resistencia hace posible la distinción, para cada antibiótico, de dos niveles de resistencia bacteriana. La llamada "resistencia de bajo nivel" corresponde a mecanismos de baja expresión, que son a veces de carácter inespecífico y debidos a alteraciones de la estructura celular, pero que pueden corresponder a mecanismos potencialmente eficientes, reprimidos en el individuo o en la población bacteriana. En otras ocasiones, estos mecanismos que expresan resistencia de bajo nivel, son grados evolutivos de mecanismos realmente eficientes aún no

desarrollados en su totalidad. En realidad la resistencia de bajo nivel suele poseer gran diversidad, reflejada en que distintos mecanismos conllevan escasos incrementos de la CMI, pero escasa especificidad como corresponde a cambios estructurales casuales o a intermediarios evolutivos. La resistencia de bajo nivel se suele expresar mediante CMIs no muy lejanas de las que muestran las bacterias consideradas sensibles, y por tanto no es de extrañar que este tipo de resistencia haya pasado desapercibido en las pruebas rutinarias de sensibilidad durante la mayor parte de la era de la quimioterapia. No obstante, las cepas que poseen mecanismos de resistencia de bajo nivel son más proclives a seleccionar células con niveles más elevados de resistencia. De ahí su importancia y la conveniencia de su detección.

La resistencia de alto nivel, indicativa de la presencia de mecanismos de resistencia eficaces, es detectable generalmente con facilidad, ya que da lugar a CMIs elevadas que indican sin duda la pertenencia a una población muy diferente de la considerada sensible. Al contrario que la resistencia de bajo nivel, suele poseer alta especificidad al implicar mecanismos concretos de inactivación del antibiótico o falta de reconocimiento de la diana molecular, y una menor multiplicidad como corresponde a mecanismos seleccionados entre otros muchos por su eficiencia. A nivel terapéutico, esta población resistente provista de mecanismos de alto nivel se correlaciona, aunque no siempre, de forma más estricta con el fracaso terapéutico.

La importancia microbiológica, epidemiológica y clínica de los mecanismos de bajo nivel depende, esencialmente, de su capacidad evolutiva hacia mecanismos de alto nivel. Es necesario no desestimar la importancia de estos mecanismos de bajo nivel, toda vez que muchos de los de alta eficiencia tienen su origen en ellos. En este sentido, los mecanismos de nivel bajo no sólo son intermediarios evolutivos secuencialmente seleccionables por el uso de antibióticos, sino propiciadores de la adquisición de genes exógenos. En efecto, para que cualquier proceso de transferencia genética tenga lugar en condiciones de presión antibiótica selectiva, es necesario que la bacteria receptora sobreviva, a expensas de un mecanismo de resistencia de bajo nivel, durante el tiempo requerido para adquirir el mecanismo de alta eficiencia. En el paciente tratado con antimicrobianos,

la presencia de un mecanismo de bajo nivel puede "evolucionar" hacia un grado de resistencia más peligroso terapéuticamente. Esto se ha demostrado para algunos microorganismos concretos provistos de determinados mecanismos de resistencia, en relación con pacientes inmunodeprimidos o provistos de material protésico. En general, considerando el conjunto de los individuos tratados en un determinado entorno: hospital, región o país, la población bacteriana dotada de mecanismos de bajo nivel de resistencia evolucionará, bajo la presión selectiva del extenso uso de antimicrobianos, hacia la selección de bacterias con alto nivel de resistencia.

Teniendo muy presentes las consideraciones previas, nos atreveríamos a afirmar que, en el plano microbiológico, una bacteria resistente es aquella que posee un mecanismo de resistencia, de bajo o alto nivel. Por el contrario, si no los posee, hablaríamos de bacterias sensibles o pertenecientes a la población sensible. Se infiere, en consecuencia, la extraordinaria relevancia que tiene la discriminación de ambas situaciones. A este propósito parece necesario diferenciar mediante concentraciones o puntos críticos, para cada binomio bacteria-antibiótico, la pertenencia a una u otra población. Los conceptos de puntos críticos de sensibilidad y resistencia, esbozados en 1980, contribuyen a la diferenciación²³.

Por concentración o punto crítico de sensibilidad microbiológica (PCSM) entendemos la concentración más elevada de antibiótico que es capaz de soportar una cepa que no posea un mecanismo de resistencia. Correspondería a la CMI que inhibe la población naturalmente sensible en un número significativo de cepas de la misma especie. Si la CMI obtenida para un antibiótico en relación con una bacteria concreta, está por debajo del PCSM, entendemos que esa bacteria carece de mecanismos de resistencia aún de bajo nivel y pertenece a la población sensible. En sentido contrario, por concentración o punto crítico de resistencia microbiológica (PCRM) entendemos la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento, bajo condiciones "in vitro" estandarizadas y controladas, de una cepa de la misma especie que codifique un mecanismo de resistencia de bajo o alto nivel. La dificultad de detectar algunos mecanismos de bajo nivel por medio de la CMI, determina esta adscripción para mecanismos "significativos" que en su gran mayoría se equipararán

a los de alta eficiencia. Este PCRM correspondería a la CMI de algunas cepas pertenecientes a la población resistente, en un número representativo de cepas de la misma especie. Si para una cepa concreta y un antibiótico determinado la CMI obtenida es superior al PCRM, sospecharíamos de la existencia de un mecanismo de resistencia habitualmente eficaz, y catalogaríamos a ese microorganismo como perteneciente a la población menos susceptible o claramente resistente.

En la práctica, la matización entre sensible y resistente, y la diferenciación de puntos críticos se realiza mediante lo que se llama internacionalmente "métodos de determinación de la sensibilidad-resistencia a los antimicrobianos". Se trata de técnicas que utilizando la difusión con discos cargados de antibiótico y la dilución en medios líquido y sólido, ponen de manifiesto la actividad inhibitoria y/o bactericida de los antimicrobianos, mediante una clasificación cualitativa o cuantitativa. De unos años a esta parte, también se utilizan técnicas que directamente ponen de relieve la presencia de mecanismos de resistencia, generalmente responsables de la inactivación enzimática del antibiótico. Como vimos en el apartado anterior referente a la resistencia genotípica, el rápido progreso de la tecnología a nivel molecular está permitiendo ya, el empleo de técnicas que facilitan el descubrimiento de nuevos mecanismos de resistencia, y la identificación de otros previamente descritos y bien conocidos.

La constatación de la antibiosis como un fenómeno natural es conocida desde el siglo XVII merced a las observaciones de van Leeuwenhoek. No obstante, la utilización de diferentes artificios, aún rudimentarios, para la puesta de manifiesto de la sensibilidad a los antimicrobianos "in vitro", data del siglo actual, y se desencadena a partir del descubrimiento de la penicilina G²⁴. A este respecto, conviene recordar las denominadas por Fleming "ditch plates", y los pocillos y cilindros realizados en el agar de cultivo, "Oxford cup" y "Heatley cup", que permitían la adición de antibiótico y la observación, transcurridas unas horas de incubación, de la inhibición del crecimiento bacteriano.

En principio, la utilización de discos de papel absorbente impregnados de solución de antibiótico tuvo más predicamento por

su sencillez. Vincent y Vincent en 1944, fueron los pioneros en incorporar una solución de penicilina a discos de papel para estudiar su actividad²⁵. Después de diferentes intentos diseñados para conseguir "cierta uniformidad" en la realización de la técnica, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1961 publica las primeras normas de estandarización de métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos²⁶. Algo más tarde, en 1966, Bauer, Kirby, Sherris y Turck, dan a conocer las especificaciones de un método por difusión con disco, que es la base de muchos de los intentos posteriores de estandarizar un método fiable y reproducible, y que fue seguido con mayor asiduidad en EE.UU y su área de influencia²⁷. En 1971, de nuevo la OMS patrocina un proyecto internacional para la estandarización de las técnicas de estudio de la sensibilidad, conocido como "International Collaborative Study" o método de Ericsson y Sherris, que sin duda fue un hito, y que se ha seguido con fidelidad, esencialmente en Europa²⁸.

El empleo de técnicas basadas en enfrentar inóculos del microorganismo responsable de un cuadro infeccioso con diluciones progresivas del antimicrobiano en el medio de cultivo, también se inicia en los días próximos al hallazgo de la penicilina G²⁴. Fleming en 1929, sugiere el empleo de la dilución en caldo para conocer la actividad de la penicilina¹, y a lo largo de las décadas de los años 40 y 50 se postulan modificaciones conducentes a conseguir la reproducibilidad de los resultados²⁴. Estos tests de dilución en caldo suponían un elevado costo en material y tiempo, por lo que a partir de la década de los años 70 se trabaja en la consecución de micrométodos, o técnicas de microdilución, más versátiles en su aplicación a la rutina diaria del laboratorio clínico. A partir de la década de los 80, y de manera progresiva, se van imponiendo métodos semiautomatizados con el denominador común del empleo de la microdilución²⁹. En la actualidad, y en muchos laboratorios clínicos, son de uso común aparatos semiautomáticos que permiten la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad de forma concomitante. Aún con excelente rendimiento, en relación con la mayoría de las bacterias patógenas habituales, estos dispositivos, afortunadamente, no incluyen en su oferta ni la indicación o necesidad de estudiar la sensibilidad a un microorganismo concreto, ni la interpretación "inteligente" de los resultados de la sensibilidad.

Las técnicas basadas en la dilución en medio sólido, comunmente dilución en agar, han ido adquiriendo prestigio como modelos o patrones del estudio de la sensibilidad. Frisk en 1945, empleó este método para conocer la actividad de la penicilina frente al neumococo³⁰. Posteriormente, su rendimiento se incrementó con el empleo de replicadores múltiples, cuyo exponente más genuino es el diseñado por Steers et al.³¹, que facilitan la aplicación al medio de un número importante, superior a 30, de inóculos bacterianos diferentes. Ciertamente, la determinación por dilución en agar de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico para un microorganismo ha tenido, y en muchos ámbitos sigue teniendo, los máximos honores entre las pruebas que estudian la sensibilidad.

En el momento actual, hay distintas versiones de estos métodos, preconizadas por países y entidades diferentes, con una elevada coincidencia en cuanto a tecnología y criterios de interpretación, cada uno de ellos ampliamente utilizado en su área de influencia. En 1968 se crea en los EE.UU el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Integrado por: expertos en microbiología, antibioterapia y enfermedades infecciosas; autoridades de la Food and Drug Administration y el Center for Diseases Control; y representantes de la industria farmacéutica y de tecnología microbiana, tiene constituido un subcomité para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos que entien-de específicamente de estos problemas y dicta las pautas a seguir³². Desde 1975, fecha en la que publicó su primer dictamen, regularmente revisa sus normas mediante publicaciones periódicas que denomina "tentative standard", "proposed standard" y "approved standard". En la actualidad, hay normas aprobadas y vigentes tanto para la técnica de difusión con disco³³, como para las de dilución³⁴, y el estudio de la actividad bactericida de los antimicrobianos³⁵. Las publicaciones del NCCLS son de referencia en EE.UU y en otros muchos países del mundo.

En Europa la dispersión normativa es algo mayor, esencialmente en cuanto a los criterios de interpretación. En los Países Escandinavos se siguen las recomendaciones del Swedish Reference Group for Antibiotics (SIR)³⁶; en Alemania los criterios del Deutsches Institut für Normung (DIN)³⁷; en los Países Bajos las propuestas del Werkgroep Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen

(WRG)³⁸; en el Reino Unido las normas de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)³⁹; en Francia las pautas de la Société Française de Microbiologie (SFM)⁴⁰. En España tienen más predicamento las publicaciones del NCCLS, aunque recientemente se ha constituido la Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA)⁴¹, con el propósito de analizar la situación en nuestro país y proponer criterios válidos que tiendan hacia un consenso europeo como el propuesto, en 1989, por el European Committee for Clinical Laboratory Standards⁴².

Con diferentes matices tecnológicos y de interpretación, que no las distancian excesivamente, todas las publicaciones antes referidas entronizan la CMI como parámetro patrón y referencia de otras técnicas, y como valor imprescindible para la diferenciación entre bacterias sensibles y resistentes. Además, coinciden en resaltar la necesidad de la reproducibilidad metodológica y de resultados, y la conveniencia de alcanzar por medio de distintos valores de CMI la predicción del resultado clínico. Así, se encuentran en la literatura aseveraciones como estas: "el objetivo esencial de los tests de sensibilidad es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo patógeno a varios antimicrobianos y traducir estos hallazgos en resultados predictivos que aseguren el éxito terapéutico"⁴³; o este otro objetivo del NCCLS "recomendar puntos críticos que permitan la predicción de la eficacia clínica y proponer normas de control de calidad que aseguren la reproducibilidad de las técnicas"³². Mientras que la reproducibilidad metodológica y de resultados es factible y deseable, aunque no a costa de plantearla como un objetivo encorsetado que impida otros propósitos, la predicción de la evolución clínica es mucho más multifactorial.

La CMI, como valor de referencia, ha estado y está constantemente "bajo fuego crítico" por legítimas razones científicas⁴⁴. Indudablemente, ha sobrevivido y continua jugando un importante papel en la microbiología clínica y en la investigación en antibioterapia. Tal vez, su solidez provenga de su necesidad y de las dificultades para sustituirla por parámetros más convincentes. En definitiva, si no la mejor técnica, al menos es la menos mala. ¿Significa esto que debe ser seguida como "dogma de fé" en la antibioterapia clínica?. Significa, obviamente, que debe ser determinada siguiendo técnicas estandarizadas y alta-

mente reproducibles; significa que deben conocerse y estimarse los factores técnicos que influyen en el resultado final; y significa que debe ser "leída" e interpretada con cautela como un parámetro más a considerar en la elección terapéutica de un antimicrobiano.

La CMI, tomada como punto de referencia, tiene la desventaja de su punto final estático con respuesta a concentraciones de antibiótico poco relacionadas, en muchas ocasiones, con las alcanzadas "in vivo" después de la administración de dosis de antibiótico más o menos estandarizadas³⁹. Además de expresar valores relacionados con la bacteriostasis, sus mayores inconvenientes radican: en que el punto final es el resultado de una serie de eventos ocurridos durante la incubación; en que no estima la actividad de concentraciones subinhibitorias ni evalúa el efecto postantibiótico; y en definitiva, en que los factores que determinan el punto final son, en si mismo variables, considerando los diferentes antibióticos y bacterias. Factores que atañen al medio de cultivo, inóculo bacteriano, estabilidad de los antibióticos, atmósfera, temperatura y duración de la incubación, influyen decisivamente en la reproducibilidad de los resultados, y cada vez son analizados con mayor rigor por las publicaciones en uso^{33-35,39}. Con todo, el parámetro de mayor relevancia, sobre todo en la discriminación entre bacterias sensible y resistentes, y en definitiva en la correlación "in vitro"- "in vivo" estriba en la elección de puntos críticos de sensibilidad y resistencia.

Los denominados "breakpoints", puntos críticos, o concentraciones críticas, son estimados como valores de concentración de antibiótico discriminatorios en la interpretación de los resultados "in vitro"³⁹. También, como criterios que categorizan una cepa concreta como miembro de una clase de organismos con algunas características de sensibilidad común, y con mayor contenido crítico y humorístico, como una mezcla de ciencia, fé y negocio⁴⁵. Sea como fuere, la publicación de la BSAC reflexiona adecuadamente estimando que los puntos críticos deberían ser el resultado de consideraciones microbiológicas, farmacocinéticas y clínicas³⁹.

Desde el punto de vista microbiológico hay que tener en cuenta que la distribución de CMIs varía con la especie, con los meca-

nismos de resistencia involucrados en cada caso, y con cada uno de los antimicrobianos, o menos estrictamente, con cada familia o grupo de antibióticos. Así, puntos críticos que "caen" en los valles de las distribuciones bimodales o polimodales, favorecen más la diferenciación de poblaciones sensibles y resistentes, mientras que los incluidos en distribuciones continuas propenden a la oscilación, dando lugar a resultados e interpretaciones erróneas de marcada repercusión microbiológica y clínica. La elección de puntos críticos para cada antibiótico y todas las bacterias posibles infiere una generalización en muchos casos errónea, que lleva a clasificar como sensibles a cepas con mecanismos de resistencia eficaces responsables de fracasos clínicos. En este sentido, no parece descabellada la propuesta de elegir tales concentraciones para cada binomio antibiótico-especie bacteriana, agrupando después los de valores próximos.

Las consideraciones farmacocinéticas no son de menor trascendencia. En teoría, una cepa es sensible si la CMI del antimicrobiano es alcanzada, al menos 2 ó 4 veces, en el suero del paciente tras la administración de dosis terapéuticas. Parece irrefutable que una infección tendrá más posibilidades de ser erradicada, o sólo responderá a la terapia antimicrobiana, si en el lugar de la infección se alcanza una concentración activa y adecuada, superior a la inhibitoria para el microorganismo causal. Ahora bien, una serie de interrogantes están por dilucidar: ¿deberemos considerar concentraciones séricas o tisulares?, ¿que parámetros farmacocinéticos son más relevantes, concentración máxima, vida media, área bajo la curva?, ¿cuantas veces debe sobrepasarse la CMI para asegurar la eficacia?. La realidad es que no se conoce bien la relación ideal entre parámetros farmacocinéticos, sensibilidad "in vitro" y respuesta clínica, y en esta situación deberemos huir de posturas maximalistas en la categorización de una cepa como sensible o resistente.

Las consideraciones clínicas son, con todo, las más difíciles de explicitar. En realidad, las bases que establecen una relación coherente entre la sensibilidad "in vitro" y la respuesta clínica no son fáciles de establecer. Es obvio que la correlación microbiológica-clínica falla con estruendo en muchas ocasiones. En teoría, la categorización de sensible para un microorganismo debería implicar una elevada probabilidad de respues-

ta terapéutica a dosis estandar, y en el mismo sentido una cepa resistente propendería al fracaso terapéutico de utilizar ese antimicrobiano. Aún con un aceptable nivel de correspondencia, no siempre se alcanzan los resultados previstos. El cúmulo de factores puestos en juego por el paciente, responden de tal grado de imprevisibilidad.

Con mayor o menor fortuna, las ciencias biológicas siempre han pretendido ser ciencias exactas. La microbiología y la quimioterapia, como ciencias biológicas, no han renunciado a aplicar criterios matemáticos como substratos de sus decisiones terapéuticas. En cierto sentido, las consideraciones acerca de la CMI y sus implicaciones se han convertido en un manual de fórmulas, más o menos complejas, tendentes a acercar la ciencia a la práctica y viceversa^{39,43,45}. La normativa vigente en los diferentes países sobre la metodología e interpretación de las pruebas de sensibilidad, descansa en la elección de dos puntos críticos de sensibilidad (PCS) y resistencia (PCR) para categorizar los microorganismos como sensibles, intermedios o de sensibilidad indeterminada, y resistentes^{33,35,36-41}. Con base en estos puntos críticos se establece la recomendación de utilizar terapéuticamente un antibiótico u otro.

El PCS debería explicitar la sensibilidad intrínseca de un microorganismo carente de mecanismos importantes de resistencia, y permitiría incluirlo entre los pertenecientes a la población sensible, mientras que el PCR pone de relieve, más que aspectos microbiológicos, el potencial farmacocinético del antimicrobiano⁴⁶. Del análisis comparativo de las diferentes propuestas de puntos críticos, sobre lo que parecería desacuerdo inicial, no deja de ser gratificante observar cierto grado de similitud en torno a un "punto teórico de consenso", fijado en aquel valor en el que más del 95% de los propuestos no difieren sino en una dilución⁴⁶. Las recomendaciones británicas (BSAC)³⁹ y alemanas (DIN)³⁷ proponen puntos críticos bajos, que favorecerían más la detección de la resistencia, y que en sentido clínico "están más a favor del paciente". Las propuestas del NCCLS³⁴ y de la SFM⁴⁰ propenden a puntos críticos más altos, con mayor tendencia a ampliar el rango de bacterias sensibles. En general, la coincidencia es mayor en cuanto a puntos críticos que delimitan resistencia, mientras que las mayores discrepancias estriban, en sus dos terceras partes, en torno a los puntos que definen

la sensibilidad⁴⁶. Sin duda, la validación científica de los puntos críticos requiere mayor precisión microbiológica y farmacocinética, y ratificación clínica en un elevado número de casos clínicos.

Este mismo año, Courvalin ha publicado un excelente artículo de opinión en relación con la interpretación y posibilidades de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, en el que define lo que llama "Interpretive Reading of Antimicrobial Susceptibility Testing"². Esta "lectura interpretativa" del antibiograma descansa en el análisis molecular de los posibles mecanismos de resistencia que subyacen en cada fenotipo de resistencia y su adecuada interpretación terapéutica. Su objetivo más práctico es ofrecer una base lógica para la toma de decisiones terapéuticas a la luz de los mecanismos de resistencia más usuales. Para ello suscita 3 pasos que incluyen: la caracterización del fenotipo de resistencia en base a un número concreto de antibióticos de cada grupo; la deducción a expensas del fenotipo del mecanismo, o mecanismos, de resistencia; y la inferencia, a expensas del mecanismo de resistencia deducido, del fenotipo establecido previamente.

Este inteligente planteamiento del problema, parte de la consideración de los antibióticos, más que como entes individuales, como miembros de grupos o familias, con características comunes en cuanto a estructura, mecanismos de acción y resistencia, y espectro de actividad. Afirma con evidente clarividencia, que los límites de los ensayos al uso se alcanzan al obtener CMIs que presuponiendo un eficaz mecanismo de resistencia, están por debajo de los límites de categorización farmacocinética y clínica más comunes. Tales límites estarían más perfilados y serían "menos peligrosos" de establecerse como fruto de análisis comparativo entre el fenotipo sensible de cada especie bacteriana, con los fenotipos de resistencia obtenidos con cada bacteria problema. Por añadidura, tal proceder hace factible la distinción entre fenotipos comunes, fenotipos raros y lo que llama fenotipos "imposibles", de tal forma que la repetición en la caracterización de estos últimos nos indicaría la verosimilitud de un nuevo mecanismo de resistencia.

Lamenta el autor, como evidente limitación de su propuesta, que no todos los microbiólogos clínicos sean expertos en el amplio

campo de la antibioterapia, y con algo de presunción afirma que la lectura interpretativa de los tests de sensibilidad es el patrimonio o la herencia de unos pocos felices expertos. De cualquier forma, la lectura interpretativa es un intento de reconciliar enfoques distintos, microbiológicos y clínicos, de un problema con distintas vertientes. Su fin último radica en facilitar al clínico los resultados precisos para su elección terapéutica, llamando su atención sobre las combinaciones concretas bacteria-antibiótico de mayor riesgo clínico.

En sintonía con esta línea de pensamiento, las conclusiones obtenidas por nosotros como fruto de la experiencia adquirida en los últimos 15 años, tras el "contacto" diario con los tests de susceptibilidad a los antimicrobianos, nos hace discurrir por el camino que propugna la delimitación de tres vertientes distintas pero interrelacionadas. De una parte estarían los aspectos microbiológicos en tanto en cuanto la distinción entre sensible y resistente, entre poblaciones sensibles y resistentes, es, esencialmente microbiológica. Los aspectos farmacocinéticos ocupan el segundo lugar, y en ocasiones, "un segundo lugar", particularmente con fármacos de elevado índice terapéutico que alcanzan con facilidad concentraciones séricas y tisulares muy elevadas. En último término, la delimitación al máximo posible de los factores clínicos que contribuyen al éxito o al fracaso terapéutico, y una definición más precisa de los mismos, permitirían establecer una mejor correlación clínico-microbiológica. En síntesis, nuestra propuesta en relación con estos aspectos incluiría:

a) Avanzar en la estandarización de técnicas de difusión o dilución que ya han mostrado su validez equiparable, y asumir su empleo como fruto de un amplio acuerdo. Además, sería muy deseable correlacionar los resultados de estas técnicas de detección fenotípica de la resistencia con los ofrecidos por los métodos de biología molecular que ponen de manifiesto la resistencia a nivel genotípico.

b) En la medida de lo posible, delimitar las concentraciones críticas de sensibilidad y resistencia motivadas por los mecanismos de resistencia más habituales para las especies bacterianas más frecuentemente aisladas, y la creación de una colección amplia de microorganismos con mecanismos genéticos y bio-

químicos de resistencia bien conocidos.

c) Definir la sensibilidad-resistencia como propiedades inherentes a cada binomio especie bacteriana-antibiótico, mediante la diferenciación de poblaciones basada en puntos críticos de sensibilidad y resistencia microbiológica. CMIs inferiores al PCSM delimitarían la población "plenamente sensible" carente de mecanismos de resistencia aún de bajo nivel; CMIs superiores al PCRM delimitarían la población "plenamente resistente" con mecanismos de resistencia de alto nivel; CMIs comprendidas, para cada caso, entre los PCSM y PCRM abarcarían a aquella población "verosimilmente sensible", pero con probables mecanismos de resistencia de eficacia baja, a la que deberíamos prestar una singular atención epidemiológica ante la posibilidad de su derivación hacia la "zona resistente de pleno derecho".

d) Tomando como guía estos puntos, creemos muy conveniente la diferenciación de fenotipos de sensibilidad-resistencia, y el análisis evolutivo de la resistencia en base a ellos, como punto de partida en el reconocimiento "in vitro" de nuevos mecanismos de resistencia.

e) Establecer, para cada antibiótico, lo que creemos se debe llamar "punto crítico farmacocinético" (PCF). En principio, debería corresponder a concentraciones séricas próximas a la Cmax, pero esto no sería óbice para estatuir PCF para otros fluidos o tejidos del organismo. Su nivel sería el techo para clasificar una cepa como sensible clínicamente, o para recomendar el uso clínico de ese antimicrobiano. CMIs inferiores al PCF pero por encima del PCRM, darían lugar a una categoría de sensibilidad clínica indeterminada, que no haría recomendable el uso clínico de ese antibiótico sino en situaciones de necesidad real.

f) Un análisis más amplio de la correspondencia entre sensibilidad-resistencia "in vitro" y evolución clínica de la infección. A este respecto, parece muy necesario la puntualización más concreta de los parámetros que llevan a definir los resultados microbiológicos y clínicos del tratamiento con antimicrobianos de la infección.

2.3 RESISTENCIA CLINICA.

Conceptualmente, resistencia clínica es un término poco definido, que debiendo hacer referencia a la relativización a aspectos farmacocinéticos y clínicos de los resultados de los tests "in vitro", en muchas ocasiones se adscribe, exclusivamente, a la evolución y resultados del tratamiento con antimicrobianos de la infección. Considerada la resistencia clínica en esta última acepción, no deja de ser un eufemismo sin valor sustantivo que llevó a Greenwood a afirmar que "extrapolar los resultados de laboratorio a la situación clínica, no deja de ser un verdadero campo de minas"⁴⁷. En su opinión, la discrepancia entre los resultados "in vitro" e "in vivo" son la resultante de dos tendencias divergentes. Mientras los microbiólogos se afanan en la consecución de la reproducibilidad sin considerar a fondo la relevancia terapéutica, los clínicos, teniendo presente ejemplos de fracaso terapéutico con antimicrobianos activos "in vitro" y viceversa, confían relativamente en los resultados del laboratorio y buscan la seguridad en la polifarmacia y en el uso masivo de antimicrobianos. La resultante de esta dinámica no podría ser otra que la confusión, mientras que la racionalidad vendría de considerar la imposibilidad de llevar al laboratorio el conjunto de circunstancias que se dan en un proceso infeccioso. La estimación global, en cada caso, de la interrelación que existe entre los factores puestos en juego por microorganismo, antibiótico y paciente, nos acercaría mucho más a la realidad, facilitaría la aproximación al concepto elusivo de resistencia clínica, y permitiría alcanzar lo que en términos clínicos se conoce como elección adecuada del tratamiento con antimicrobianos⁴⁸.

Es muy cierto que las categorías de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antibióticos nacieron como una forma de expresar al clínico responsable del tratamiento de la infección, los resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas en el laboratorio con la pretendida bacteria causal. En realidad, lo que el microbiólogo expresa como "bacteria sensible" es comprendido generalmente por el clínico como "infección sensible" a ese antimicrobiano. En muchas ocasiones tal aseveración, sino falsa resulta equívoca, y la experiencia ha venido a constatar el fracaso terapéutico con microorganismos etiquetados por el laboratorio como sensibles⁴⁹. Por el contrario, la asociación

"bacteria resistente" con el concepto "infección resistente" se ha refrendado con éxito aún más frecuentemente, y es esta correlación la que ha permitido que las pruebas de sensibilidad hayan mantenido su crédito durante cerca de medio siglo. Parece, por tanto, necesario, asegurar el concepto y el reconocimiento de la resistencia y a este fin deben dedicarse los máximos esfuerzos como primer paso para armonizar la correlación "in vitro"- "in vivo"⁵⁰.

Respecto del microorganismo causal, resulta irrenunciable conocer su correcta identidad, estimar su virulencia, y "asegurar" su sensibilidad por técnicas fiables y reproducibles. Teniendo en cuenta las puntualizaciones esbozadas en los apartados referentes a la resistencia genotípica y fenotípica, parece conveniente reflexionar sobre el llamado "valor predictivo clínico" de los tests de sensibilidad a los antimicrobianos⁵¹. En este punto, algunos autores han considerado "un mito" la predictibilidad de los tests de sensibilidad en relación con la evolución y el resultado clínico⁵². Sin embargo, la mayoría se inclina, como postura más razonable, por considerar los límites intrínsecos de dichos tests en cuanto a las variables metodológicas que en ellos intervienen y en cuanto a su repercusión en el resultado clínico^{11,49,53-55}. Como ya hemos comentado, resultan esenciales los factores referentes a: medio de cultivo, estabilidad de los antibióticos ensayados, inóculo bacteriano, atmósfera, temperatura y duración de la incubación, y lectura e interpretación del punto final. Con todo, la elección de los puntos críticos que delimitan la sensibilidad-resistencia, tiene la máxima responsabilidad, y a este respecto no podemos desestimar que para algún autor, la arbitrariedad es su característica más sustantiva⁴⁷.

De cualquier forma, resulta sorprendente la ausencia de estudios bien diseñados al efecto, que evalúen la capacidad predictiva clínica de los estudios de sensibilidad¹¹. Lorian, en 1990, afirma que sobre 5.000 estudios de sensibilidad "in vitro" publicados en lengua inglesa en la última década, muy pocos analizan la relevancia que tienen en el resultado final del tratamiento con antibióticos⁵⁶. No obstante, el mismo autor en un trabajo que incluye 298 pacientes evaluados a este fin, estima en más del 80% la concordancia entre los resultados "in vitro" y la evolución clínica de uno u otro signo⁵⁶. Parece,

por tanto, que las afirmaciones vertidas sobre el valor predictivo de los tests de sensibilidad, son más bien fruto de la subjetividad, que del análisis objetivo de los datos. A este respecto, debemos señalar la "indeterminación" o la amplitud de los términos en que se valoran los resultados microbiológicos y clínicos del tratamiento con antimicrobianos. Con los parámetros habituales, pueden coincidir la erradicación o la persistencia del patógeno, con el éxito, la mejoría, o el fracaso clínico. En este contexto, es imposible definir la resistencia clínica como balance final del tratamiento. Con toda seguridad, el valor predictivo clínico de los tests de sensibilidad se vería muy favorecido con una evaluación microbiológica en términos más estrictos, y con una estimación "mas cuantitativa" del resultado clínico.

A pesar de la indeterminación en que nos movemos, Stratton ha efectuado recientemente una estimación del valor predictivo de los diferentes tests de sensibilidad más comunes, analizando por separado su repercusión en el paciente inmunocompetente y en el inmunodeprimido, en términos de excelente, aceptable, bajo y nulo¹¹. En general, siguiendo técnicas reproducibles, considera que el valor predictivo de las técnicas de sensibilidad es más que aceptable, si se tienen en cuenta en cada caso, los factores que atañen de manera específica al paciente como receptor del antimicrobiano y como huésped del microorganismo infectante.

Otra vertiente determinante de la resistencia clínica, considerada mejor como fracaso terapéutico, y además punto fundamental en la elección adecuada del antibiótico, atañe a los aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos inherentes al antimicrobiano^{1,57,58}. Así, el efecto inhibitorio vs. bactericida, las actividades subinhibitorias y suprainhibitorias, el efecto dependiente del tiempo de actuación o de la concentración de antibiótico y el efecto postantibiótico, contribuyen a la actividad antibiótica, y en muchos casos no pueden ser, o no son, valoradas por los métodos "in vitro". Por el momento, no se ha definido la interrelación entre farmacocinética y resultado clínico. Las diferentes características de absorción, distribución, unión proteíca, metabolismo y eliminación, de los distintos antimicrobianos han de ser estimadas antes de producirse la elección terapéutica.

Por otra parte, la interpretación de los tests de sensibilidad se ha fundado en amplia medida, como ya hemos comentado, en la comparación de la CMI con los niveles alcanzables en el organismo tras administrar una dosis terapéutica estandar. La indecisión farmacológica acerca de los parámetros farmacocinéticos más relevantes: Cmax sérica o tisular, área bajo la curva, punto medio de la distribución, y las dudas respecto de las veces que la CMI debe ser alcanzada, han contribuido a la confusión respecto de los valores críticos de discriminación entre antibiótico "recomendable" o "no aconsejable". Actualmente, y más por la perentoriedad de elegir un parámetro que por la convicción plena de su valor real, se estima que la Cmax de cada antibiótico es el valor farmacocinético que debe aconsejar la elección de puntos críticos⁵⁹. Ello no es óbice, para que la elección correcta del fármaco provenga, además, de la consideración del resto de los índices que definen la farmacocinética de un antimicrobiano.

Finalmente, todos los factores relacionados con el paciente en tanto que hospedador o indeseado anfitrión, son de la máxima importancia en el resultado final del tratamiento^{48,60,61}. La historia previa de reacciones adversas, la edad, el embarazo, las posibles alteraciones genéticas y metabólicas, la existencia de disfunción hepática y renal, la concomitancia con factores inmunosupresores, la presencia de cuerpos extraños, y muy especialmente la localización del lugar de la infección y la llegada del antibiótico al mismo, son circunstancias esenciales en la elección de un fármaco y determinantes en la correlación microbiológica-clínica del tratamiento con antimicrobianos.

3. ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS: DESARROLLO Y PERSPECTIVA HISTORICA.

Los antibióticos betalactámicos (ABL) son el grupo terapéutico más extenso y de mayor popularidad de entre todos los antimicrobianos. En la actualidad un número próximo a las 100 moléculas diferentes, provistas en su estructura del anillo betalactámico unido a diferentes grupos químicos, están disponibles para ser utilizadas en el tratamiento de la infección bacteriana.

Su desarrollo, a lo largo de los pasados sesenta años, es una concatenación de circunstancias y hechos, que después se van a repetir a modo de matriz en el desarrollo de antimicrobianos pertenecientes a familias distantes desde una perspectiva estructural y biológica. Su origen natural, ligado a diferentes hongos, **Streptomyces**, y bacterias fue progresivamente sustituido por procesos semisintéticos o de síntesis total que mejoraron considerablemente el rendimiento. La profundización en los mecanismos de acción y resistencia, y en consecuencia en la relación estructura-actividad, ha permitido seleccionar sustancias con dianas de acción específicas, dotadas de propiedades de penetración intracelular y resistencia a la inactivación por enzimas bacterianos, que poco a poco han expandido el espectro antimicrobiano e incrementado hasta índices inverosímiles la actividad intrínseca. Los estudios experimentales bien diseñados y controlados en animales y humanos, han hecho posible, de manera gradual, la consecución de fármacos con características farmacocinéticas óptimas, dotadas de la mínima toxicidad para las células eucarióticas y un amplio margen terapéutico, y con excelente eficacia clínica. Todas estas son las razones que aproximan a los ABL al antibiótico ideal y las que justifican su amplio empleo clínico.

Desde otra perspectiva, más relacionada en el tiempo con la propia evolución de la etiología bacteriana de la patología infecciosa, es preciso recalcar la constante respuesta ofrecida por los ABL a los cambios cualitativos en el patrón e incidencia de aislamiento a lo largo del último medio siglo, y a las sucesivas modificaciones del perfil de sensibilidad como consecuencia del predominio gradual de cepas con mecanismos de resistencia cada vez más amplios y eficaces, desplegados por las bacterias como respuesta al diseño y uso de nuevos antimicrobianos. Así se han desarrollado sucesivamente penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, antibióticos monobactámicos, inhibidores de betalactamasas, penems y carbapenems, que integran hoy la extensa familia de ABL⁶²⁻⁶⁵.

3.1 PENICILINAS.

Esta dilatada historia, en cierta acepción "interminable" pues su punto final no se ve próximo, comienza con la observación de

Fleming¹ en 1928 de la inhibición del crecimiento de *S. aureus* por colonias de *Penicillium rubrum*, más tarde correctamente identificado como *Penicillium notatum*⁶⁶. La obtención del producto microbiológicamente activo, denominado penicilina, es difícil, no obstante Fleming en 1932 aplica un filtrado del hongo en el ojo de un paciente afecto de conjuntivitis por *S. pneumoniae* con resultado positivo, que es ratificado ese mismo año por Paine en el tratamiento de infecciones oculares por estafilococo, neumococo y gonococo. En 1940 tiene lugar un paso adelante sustantivo con la formación del grupo de trabajo de Oxford, integrado esencialmente por Chain, Florey y Heatley, que mejoran el rendimiento en la extracción de la penicilina, aún cuando ponen de manifiesto la inestabilidad de la molécula. Ese mismo año, Abraham y Chain constatan que el extracto de un cultivo de *E. coli* inactiva la penicilina y adelantan la hipótesis de un mecanismo de inactivación enzimática llamando al enzima penicilinasas⁶⁷. Las bases de la moderna antibioterapia están esbozadas en sus pasos iniciales a nivel experimental, y son recogidas por Abraham et al. en un artículo publicado en Lancet en 1941 que resume el esfuerzo de 10 años de investigación⁶⁸.

En la década de 1940, la industria farmacéutica acepta el reto que supone la obtención rentable de la penicilina. Trabajando con mutantes inducidos por radiación de *Penicillium chrysogenum*, que crece con mayor rapidez, se obtiene un rendimiento del proceso de fermentación considerablemente mayor que con la cepa original. Se constata que este material de fermentación es en realidad una mezcla de sustancias relacionadas, corroborando que las penicilinas son una familia de productos naturales estructuralmente formadas por la fusión de dos anillos tiazolidínico y betalactámico al que está unido un grupo acil. En 1943 el incipiente grupo Squibb prepara la primera penicilina en estado cristalino puro, bencilpenicilina sódica o penicilina G, y de ahí en adelante en el Reino Unido las diferentes penicilinas se denominan con letras, X, G, F y K, mientras que en EE.UU se significan con números. La penicilina G, elegida por sus propiedades biológicas, se produce casi exclusivamente por fermentación después de añadir la cadena lateral en forma de ácido fenilacético como precursor. Dado que la síntesis total plantea diversos problemas, esta vía parece más conveniente y así se obtiene en 1948, utilizando como precursor el ácido fenoxiacético, la penicilina V o fenoximetil penicilina, caracterizada

por ser estable en medio ácido lo que permite su administración oral⁶⁹.

El camino para las penicilinas semisintéticas parece iniciado, aunque en muchas ocasiones la aceptación del precursor por el hongo se realiza con dificultad. Se recurre a la modificación química de penicilinas obtenidas por fermentación, y en 1957, en un ensayo control llevado a cabo en ausencia del precursor de la cadena lateral, se obtiene como producto natural el ácido 6-amino penicilánico (6-APA), considerado en adelante como la molécula base y punto de partida del amplísimo desarrollo de las penicilinas⁷⁰. Se trata de una molécula con estructura penam con un grupo amino en el carbono 6, obtenida en cantidades considerables por fermentación, que también se ha logrado con posterioridad por eliminación química o enzimática de la cadena lateral de la penicilina G. Las modificaciones estructurales que permite su molécula, por adición de diferentes radicales al grupo amino en C₆ y los cambios que ello conlleva en la actividad antimicrobiana, facilitaron la consecución de nuevas penicilinas con mayor espectro y actividad intrínseca⁷¹.

La penicilina G se mostraba esencialmente activa frente a cocos gram-negativos y gram-positivos, incluyendo la práctica totalidad de cepas de estafilococo. En 1944, Kirby, correlaciona la producción de penicilinas con la resistencia de *S. aureus* a la penicilina⁸. En 1948, el 50% de las cepas eran resistentes por producción de penicilinas y 10 años después la incidencia de resistencia alcanzaba cifras próximas al 80%. En otras palabras la penicilina G había dejado de ser útil en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*, y se precisaba una alternativa eficaz. El desarrollo de penicilinas semisintéticas con elevada estabilidad a la betalactamasa (β la) estafilocócica no se hace esperar. La meticilina, 2,6-dimetoxifenil penicilina, aparece en 1960 como una solución válida a la producción de penicilinas por su baja afinidad⁷². Nafcilina y oxacilina, provistas de cadenas laterales relacionadas, mejoran su actividad intrínseca. La introducción de uno o más halógenos en la molécula de la oxacilina, permitió la síntesis de la cloxacilina, dicloxacilina y flucloxacilina, más estables a la inactivación metabólica y absorbibles por vía oral^{62,63}.

La síntesis de la ampicilina en 1961 y su posterior uso clíni-

co, constituyen uno de los hitos más relevantes de la moderna antibioterapia⁷³. Se trataba de la primera penicilina de amplio espectro activa frente a bacilos gram-negativos, que en aquellos momentos comenzaban a desplazar a los microorganismos gram-positivos como causa más frecuente de infección. Sin duda, la ampicilina constituye un antibiótico emblemático pues a las propiedades de la penicilina G agrega su actividad frente a algunas **Enterobacteriaceae** y **Haemophilus**, y la posibilidad de administración oral. Después, su biodisponibilidad por esta vía sería mejorada con prodrogas del tipo de la hetacilina, pivampicilina, talampicilina y bacampicilina, y de manera más eficiente con la síntesis de la amoxicilina, antimicrobiano con el mismo espectro de actividad, mayor actividad bactericida frente a algunos microorganismos y una excelente absorción y estabilidad oral⁷⁴. Por otra parte, las características de los nuevos ABL comienzan a diferenciarlos de la penicilina G inicial. En 1972, se sintetiza el mecilnam o ácido 6 β -amidino penicilánico, que se fija esencialmente a la PBP 2, poco activo en gram-positivos y más eficaz en gram-negativos incluyendo **Serratia** y alguna cepa de **Proteus** resistentes a la ampicilina⁷⁵.

La actividad frente a BGNNF, **Pseudomonas** y **Acinetobacter**, fue hasta 1967, una de las "asignaturas pendientes" de las penicilinas naturales y semisintéticas. En ese año la síntesis de la carbenicilina mitiga este problema y evidencia que la introducción de un grupo carboxilo contribuye a incrementar el espectro y proveer a la molécula de cierta estabilidad frente a las β las cromosómicas de gram-negativos⁷⁶. La ausencia de absorción por vía oral promueve la obtención de prodrogas en forma de α -carboxi ésteres, carindacilina y carfecilina, que mejoran parcialmente este problema, aunque sólo están indicadas en infecciones localizadas en sitios donde el fármaco se concentra de manera más significativa.

A partir de la carbenicilina la investigación de nuevas penicilinas se conduce a expensas de modificaciones en su molécula, ticarcilina y sulbenicilina, o mediante la síntesis de derivados N-acil ureido o 2,3 dioxopiperacínicos de la ampicilina: mezlocilina, azlocilina y piperacilina^{62,63}. Todos ellos muestran una mayor potencia que la carbenicilina, esencialmente frente a **P. aeruginosa**, aunque a expensas de un efecto bactericida más bajo. En ningún caso, todas estas penicilinas semisin-

téticas de amplio espectro muestran estabilidad a las β-lactamas plasmídicas de gram-negativos, objetivo alcanzado en 1982 tras la síntesis de la temocilina o 6-metoxi ticarcilina, resistente a la inactivación enzimática, pero inactiva frente a *P. aeruginosa* y microorganismos gram-positivos⁷⁷. El espectro de actividad de esta última penicilina es la imagen especular o el negativo del de la penicilina G. En poco más de 50 años, la evolución en las propiedades de las penicilinas no ha sido sino el reflejo de la evolución de la etiología de la infección, y de los problemas de resistencia planteados por las bacterias en respuesta a la síntesis de nuevos antimicrobianos.

3.2 CEFALOSPORINAS Y CEFAMICINAS.

Las cefalosporinas constituyen un extenso grupo terapéutico de antibióticos bactericidas, de espectro muy amplio y farmacología diversa, cuyos efectos secundarios no son, generalmente, ni graves ni frecuentes. Se puede afirmar, sin mucho riesgo, que son antibióticos "cómodos" de prescribir y con fama de "seguros" por la problemática poco complicada que suele acompañar a su elección y utilización. Paradójicamente y a pesar de que su indicación está reconocida como de 1ª elección sólo en infecciones concretas y algunas en profilaxis, son ampliamente utilizadas tanto en el medio hospitalario como en la comunidad⁶⁴.

Su desarrollo adquiere el punto álgido a lo largo de la década de 1970 y se ve muy beneficiado por la similitud de circunstancias acaecidas años antes con la penicilina G, y por el amplio conocimiento de la relación estructura-actividad generada en el largo proceso de investigación de nuevas penicilinas^{78,79}. Se trata de una nueva "historia interminable" con principio en 1945, cuando Brotzu, en Cagliari (Italia), presupone un fenómeno de antibiosis natural en las aguas residuales de esa ciudad, responsable de la baja contaminación por bacterias de origen fecal⁸⁰. Aísla un hongo, *Cephalosporium acremonium*, cuyo extracto tiene un amplio espectro de inhibición de microorganismos gram-negativos, y a partir de ese momento el proceso histórico de investigación seguido con la penicilina G se repite aunque con mayor celeridad.

Inicialmente, se encuentran dos sustancias con capacidad anti-

biótica: la cefalosporina P, un esteroide relacionado con el ácido fusídico, y la cefalosporina N, un péptido inestable con estructura próxima a la de las penicilinas. En 1953, de manera "casi casual", en un estudio cromatográfico diseñado para diferenciar más nítidamente la cefalosporina N, se obtiene un nuevo producto, la cefalosporina C, con una cadena lateral D- α -amino-adipil, provista de una estimable estabilidad a la penicilinasasa estafilocócica y un espectro de actividad en el que se incluían algunas bacterias gram-negativas⁸¹. Pocos años después, en 1961, Abraham y Newton⁸² desvelan la estructura de la cefalosporina C, que comienza a ser producida a nivel industrial por diferentes compañías farmacéuticas, y algo más tarde, los mismos autores establecen que el ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA), producido por la hidrólisis ácida de la cefalosporina C, es el equivalente del 6-APA y podría ser la estructura esencial para el desarrollo de múltiples moléculas con propiedades bien diferenciadas.

Estructuralmente, las cefalosporinas son compuestos muy interesantes. Tal vez, conforman la familia de antimicrobianos en cuyo desarrollo mejor se ha plasmado la búsqueda de un espectro total motivado por la evolución de la etiología bacteriana de la infección a lo largo del tiempo, y las posibilidades de la química farmacéutica para superar la inactivación por β las. Además, y como otra constante, se ha ido detrás de la consecución de fármacos con características farmacocinéticas más favorables, exentas de toxicidad para la célula eucariótica. El precursor de toda la familia, ácido 7-ACA, es una molécula resultado de la fusión de los anillos dihidrotiazínico y betalactámico, de enorme versatilidad, que admite bien la adición de diferentes radicales en C₁, C₃ y C₇⁷⁸. Mientras que las sustituciones químicas en C₁ y C₇ afectan a la actividad antimicrobiana por inferir mayor estabilidad a las β las o más actividad intrínseca, las modificaciones en C₃ varían las propiedades farmacocinéticas del antibiótico⁷⁹.

Así, se han ido desarrollando, al menos, tres generaciones de cefalosporinas, en las que progresivamente se ha buscado una mayor estabilidad a las β las plasmídicas y un espectro más dirigido hacia microorganismos gram-negativos, en detrimento de su eficacia frente a bacterias gram-positivas⁶⁴. En otro orden, se ha pasado de fármacos de administración parenteral a otros

con buena biodisponibilidad oral, sin disminución relevante del espectro amplio ni de la actividad antibacteriana. En este sentido, las cefalosporinas más antiguas, cefalotina y cefaloridina, introducidas en la terapia antiinfecciosa a mediados de la década de los 60, difieren notablemente de las más recientes, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefixima y cefdinir.

Las cefalosporinas primigenias, denominadas de la 1ª generación, cefalotina (1962) y cefaloridina (1964), mostraban una elevada actividad "in vitro" frente a microorganismos gram-positivos, *Staphylococcus* y *Streptococcus* excepto enterococo⁶⁴. Por el contrario, su espectro frente a gram-negativos estaba limitado a *E. coli*, *Klebsiella* y *P. mirabilis*, siempre que la producción de β la no alcanzara niveles elevados. Los problemas locales derivados de su administración parenteral y sus características farmacocinéticas poco favorables, propiciaron el hallazgo de otras moléculas de aplicación parenteral, cefazolina⁸³, cefapirina, ceforanida, o bien de administración oral, cefalexina, cefradina, cefadroxilo, que sin aumentar el rendimiento microbiológico, si favorecían su utilización clínica. De esta manera se configuró un conjunto de cefalosporinas consideradas, entonces y ahora, de elección en infecciones causadas por los microorganismos citados y fármacos de primer orden en la profilaxis quirúrgica⁶⁴.

Las cefalosporinas de la 2ª generación ubicadas en la década de 1970 tanto a nivel de investigación como de aplicación clínica: cefamandol⁸⁴, cefuroxima, cefonicid, cefotiam y cefaclor, suponen en conjunto un proyecto muy interesante⁶⁴. La coincidencia, en el tiempo, de su desarrollo con una etapa de amplia investigación en los mecanismos de resistencia a ABL, concita que estas moléculas puedan considerarse, a modo de precursores, un anteproyecto estructural para el diseño químico de ABL posteriores. Ciertamente, las modificaciones individualizadas en cada una de las moléculas y las características que les infieren dieron paso, pocos años más tarde, a modificaciones en conjunto que determinaban la yuxtaposición en una sola molécula de las propiedades de varias previas. Así, el grupo imino sustituido de la cefuroxima, el 2-aminotiazol del cefotiam, y el N-tiotetrazol del cefamandol, se van a repetir conjuntamente en muchos ABL aparecidos a partir de 1980⁷⁹. En consonancia con ello, las cefalosporinas de la 2ª generación amplían notablemente su es-

pectro en relación con las previas, aunque como grupo pierden cierta homogeneidad en la actividad microbiológica frente a gram-negativos, de manera que, dentro de ciertos márgenes, cada cefalosporina viene a ser más específica de una o varias especies. Desde una perspectiva clínica, han demostrado su eficacia en infecciones graves por **Enterobacteriaceae** y, con la excepción de cefamandol, pueden ser de elección en la patología infecciosa comunitaria por **H.influenzae** y **N. gonorrhoeae** productores de β la⁶⁴.

Las cefamicinas también suponen un proyecto estructural de gran interés, aunque originalmente, como penicilinas y cefalosporinas, se obtienen de microorganismos del suelo. En 1972, y como productos obtenidos en la fermentación a expensas de **Streptomyces lactamdurans**, se diferencian las cefamicinas A, B y C, de las que la última parece la más prometedora⁸⁵. La presencia de un grupo metoxi en posición 7a le otorga elevada resistencia a las β las plasmídicas, aunque parece ser el responsable de la disminución de la potencia antimicrobiana frente a gram-positivos.

La cefoxitina es el antibiótico piloto del grupo, y además del grupo metoxi posee en 7a un grupo tienilacetil en vez del ácido α -aminoadípico de la cefamicina C, y en C₃ un grupo carbamoil que incrementa "in vivo" la estabilidad metabólica⁸⁶. Sus aportaciones microbiológicas son sustanciales tanto en espectro, primer ABL realmente eficaz en **B. fragilis**, como en proporción de aislamientos de **Enterobacteriaceae** inhibidos, dada su resistencia a la hidrólisis enzimática por las β las plasmídicas, muy frecuentes en esa familia bacteriana. Posteriormente, se han desarrollado otras cefamicinas con ventajas marginales sobre lo ofrecido por cefoxitina⁶⁴: el cefmetazol es prácticamente superponible a la cefoxitina y el cefotetan con un espectro coincidente tiene mayor actividad intrínseca en microorganismos gram-negativos. El uso clínico de las cefamicinas nunca ha sido muy amplio, aunque se han mostrado eficaces en el tratamiento de infecciones intraabdominales y pélvicas, en las que la participación de **Bacteroides** es relevante, y también han sido preconizadas en la profilaxis de la cirugía intraabdominal⁶⁴.

Las cefalosporinas de la 3ª generación, o cefalosporinas de los años 80, suponen junto a otros ABL, monobactams y carbapenems,

el intento más sólido y ambicioso de la quimioterapia antimicrobiana de alcanzar la quimera del antibiótico ideal, dotado de amplísimo espectro de actividad, estabilidad a los mecanismos de resistencia bacterianos, farmacocinética propicia para la administración más cómoda y espaciada, y ausencia o minimización de efectos secundarios^{64,87}.

Las aminotiazol-oxiimino cefalosporinas, cefotaxima⁸⁸, ceftizoxima, cefmenoxima, ceftriaxona, cefpiroma y ceftazidima⁸⁹, son consideradas el grupo más genuino. Su analogía proviene de compartir en C7 el grupo 2-aminoatiazol "heredado" del cefotiam y el grupo imino sustituido "tomado" de la cefuroxima. Estos radicales les otorgan, mayor resistencia a las β las plasmídicas clásicas y mayor actividad intrínseca, como consecuencia de la mejor afinidad por las proteínas esenciales que fijan la penicilina, y de las mayores posibilidades de entrada al interior de la célula bacteriana⁷⁹. En consecuencia, y aunque su actividad "in vitro" frente a gram-positivos no aporta nada de interés en relación a las primeras cefalosporinas, son excepcionalmente activas en gram-negativos, particularmente *Enterobacteriaceae* y también en *Haemophilus* y *Neisseria* independientemente de la producción de β la. Además, la ceftazidima, por su grupo carboxipropil-oximino en C7 que la diferencia de las demás, es la única aminotiazol-oxiimino cefalosporina con importante actividad "in vitro" frente a *P. aeruginosa* y algo inferior en otros BGNNF⁸⁹.

La gravedad de las infecciones por *P. aeruginosa* en un tipo determinado de pacientes, y el reducido número de antibióticos eficaces carentes de efectos indeseables, propició la investigación de ABL con tal espectro. El precedente de las penicilinas semisintéticas, fue remedado con las cefalosporinas agregando al núcleo central de la molécula radicales del tipo carboxipropil, carboxilo, sulfónilo y 2,3 dioxopiperazina^{79,87}. Así, además de la ceftazidima que bien pronto gana el merecido crédito en el tratamiento de infecciones por este microorganismo, surgen, cefoperazona, cefpiramida y cefpimizol, con un espectro similar, y la cefsulodina, que tiene limitada la actividad antimicrobiana a *P. aeruginosa*^{64,87}. Moxalactam, un antibiótico oxa- β -lactámico, con O en vez de S en C1, un grupo metoxi en 7a, y un grupo carboxilo en 7b, fué un estimable intento de aglutinar en una misma molécula el espectro de las amino-

tiazol cefalosporinas, y la eficacia de las cefamicinas en *B. fragilis*⁹⁰. Lamentablemente, su toxicidad en relación con los mecanismos de coagulación desaconseja su uso y prácticamente está descartado de los formularios antimicrobianos.

Las posibilidades de elevar el rendimiento clínico de estas cefalosporinas a expensas de replantear sus características farmacocinéticas se buscaron, esencialmente, introduciendo nuevos grupos químicos en C₃^{79,87}. De esta forma se fueron desarrollando fármacos con propiedades en cierto modo dispares, no absorbibles por vía oral, por lo que la administración es exclusivamente parenteral. Con la excepción de ceftriaxona y cefoperazona que muestran eliminación hepática, el resto se excretan fundamentalmente por vía renal como productos activos. La cefotaxima es metabolizada a su forma desacetilada menos activa, eliminándose el 20%-40% de esta manera. La vida media de eliminación oscila entre 1 hora para la cefotaxima y 8 para la ceftriaxona, diversificando sus posibilidades terapéuticas. Sin duda, la característica más relevante de estos fármacos es su capacidad de pasar la barrera hematoencefálica con las meninges inflamadas, lo cual permite para la mayoría, alcanzar niveles terapéuticos en LCR sin recurrir a la vía intratecal. Todo ello, y los efectos secundarios no frecuentes y de moderada trascendencia clínica, han hecho de las cefalosporinas de 3ª generación, antimicrobianos eficaces y seguros cuyo empleo es cada día más común.

En los últimos 4 años se ha sugerido la conveniencia de "abrir cauce" a una nueva generación de cefalosporinas, que se denominarían de 4ª generación, y que albergaría a un grupo interesante de nuevas moléculas de administración oral, algunas desarrolladas como prodrogas, que persiguen unificar en la misma molécula el espectro de las anteriores y la comodidad de su administración. Así nacen, sucesivamente, ceftetrame, cefetamet, cefixima, cefpodoxima y cefdinir, que a su biodisponibilidad oral añaden un espectro amplio en gram-negativos, aunque son inactivas en *P. aeruginosa*, y, generalmente, y mucho más reducido frente a gram-positivos. La posibilidad de continuar en el medio extrahospitalario, el tratamiento de infecciones graves por gram-negativos, debería ser el enfoque más conveniente de estas nuevas cefalosporinas.

3.3 MONOBACTAMS, INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS Y CARBAPENEMS.

El éxito en la consecución de nuevos ABL con características microbiológicas y farmacocinéticas estimadas casi quiméricas años atrás, refuerza la investigación en nuevas sustancias con capacidad antibiótica producidas por microorganismos. En este sentido, y en pocos años, se avanza considerablemente en el estudio de nuevos antibióticos producidos por bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Chromobacterium*, y en *Streptomyces*. Los resultados no se hacen esperar, y la década que comienza en 1980 es prolija en el desarrollo de antibióticos monobactámicos y carbapenémicos, y en otro tipo de ABL carentes de actividad antibacteriana relevante "per se", si bien están dotados de un potente efecto inhibidor de betalactamasas⁶⁵.

Los monobactams son antibióticos monocíclicos, naturales y de síntesis, caracterizados por tener solamente el anillo β -lactámico con diferentes cadenas laterales en C₁, C₃ y C₄⁹¹. El sulfazecin (1979), es un monobactámico natural obtenido de *P. acidophila*, que principia una serie de múltiples sustancias procedentes de bacterias, caracterizadas por poseer el anillo 2 oxoazetidina-1 ácido sulfónico, una cadena lateral acil en 3 β , y un grupo metoxi en 3a. El denominado SQ 26.180, procede de *C. violaceum* y es la base para la obtención de diferentes monobactámicos de síntesis, en un intento de mejorar la moderada actividad antimicrobiana de los productos naturales. La síntesis química posibilita la adición al núcleo central, de los diferentes radicales con actividad específica de penicilinas y cefalosporinas, en un proceso de antimicrobianos "a medida". Sorprendentemente, el eficaz grupo metoxi dificulta la síntesis de antibióticos con estabilidad química. Por el contrario, su reemplazo por hidrógeno y la introducción de grupos aminotiazoloxima en 3 β y 4-alquil, da lugar a antimicrobianos similares a las cefalosporinas de 3 α generación.

El aztreonam es el primer monobactam de síntesis con excelente actividad en gram-negativos, aunque exento de la misma en gram-positivos y anaerobios por carecer de afinidad sobre sus PBPs esenciales⁹². Sus características antibacterianas y su actividad frente a *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* y *Neisseria*, son superponibles a los de las cefalosporinas de 3 α

generación, aunque es hidrolizado por la β la K_1 de *K. oxytoca*. Se administra exclusivamente por vía parenteral y es muy adecuado, por su único anillo, para pacientes hipersensibles a otros ABL. En un intento de potenciar sus propiedades y conseguir la biodisponibilidad oral, en los últimos 6 años se han desarrollado con relativo éxito, diferentes monobactámicos de síntesis. El carumonam, es un antibiótico parenteral con mayor estabilidad a K_1 , similar espectro de actividad que aztreonam y 2/4 veces más activo en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. Pírazmonam, con un grupo piperazina, ofrece mayor actividad solamente en *P. aeruginosa*.

Los monobactámicos orales se inician con el oximonam, provisto de un grupo acetoxi en C_1 , inactivo en *P. aeruginosa* y menos activo que aztreonam en otros gram-negativos. Tigemonam posee un grupo carboximetil en C_3 y dos grupos metil en C_4 , y parece más estable que aztreonam a K_1 . Su actividad es inferior en *Enterobacteriaceae*, es inactivo en *P. aeruginosa*, e incluye en su espectro algunas cepas de *Streptococcus*. Los monocarbans son ABL monocíclicos con un grupo sulfonilaminocarbonil y diferentes radicales en C_1 . El U-78608 es el más representativo y sólo superior a aztreonam en *P. aeruginosa*. En síntesis, ninguno de los nuevos monobactámicos supera claramente al aztreonam, un antimicrobiano de reconocido prestigio en el tratamiento de infecciones por gram-negativos. Ello, unido a problemas de diferente etiología surgidos en las fases experimentales, han determinado que, por el momento, ningún otro monobactam distinto del aztreonam esté introducido en la práctica clínica.

El periodo comprendido entre los años 1965 y 1980 es pródigo en hallazgos que van a solidificar la interdependencia β las-ABL. En la medida que se van conociendo mejor los diferentes aspectos bioquímicos y cinéticos de las β las, se desarrollan programas de investigación dirigidos a potenciar la búsqueda de sustancias naturales que contrarresten la actividad enzimática. Dos grupos de compuestos se delimitan con nitidez: inhibidores de β las sin otra actividad antimicrobiana, y penems y carbapenems, con un singular efecto inhibitor al que se añade un amplísimo espectro antimicrobiano⁶⁵.

Los inhibidores de β las se caracterizan por una elevada afinidad por los enzimas, que les permite proteger de manera selec-

tiva a otros Aβl lábiles a la acción hidrolítica^{93,94}. El más representativo, a. clavulánico, se obtuvo como producto natural de *S. clavuligerus*, y asociado a amoxicilina y ticarcilina, ha alcanzado un prestigio singular en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos productores de βlas plasmídicas^{95,96}. Posteriormente, sulbactam, asociado a ampicilina, y tazobactam, asociado a piperacilina, han evidenciado eficacia en un ámbito similar al del a. clavulánico, y en cierto sentido poseen un efecto inductor de βlas cromosómicas inferior al de aquél⁹⁷. Recientemente, el compuesto BRL 42715B asocia al potencial de inhibición de los anteriores sobre enzimas de codificación plasmídica, un extenso poder inhibitorio de βlas cromosómicas, con ausencia de efecto inductor, abriendo un interesante camino en la consecución del "inhibidor total"⁹⁸. Es interesante resaltar que estas moléculas con estructura betalactámica también son inhibidores de la mayoría de las nuevas βlas plasmídicas de espectro ampliado, caracterizadas desde 1983, que comprometen seriamente la eficacia de penicilinas, cefalosporinas y monobactams.

Los penems son antimicrobianos de síntesis, con estructura próxima a las de las penicilinas de las que se diferencian por tener un enlace insaturado entre los carbonos 2 y 3. Tienen un espectro amplio, con actividad en gram negativos, excepto en *P. aeruginosa*. Se han desarrollado hasta fases muy avanzadas diversos compuestos de administración parenteral, FCE-22101, SCH-34343, y otros absorbibles por vía gastrointestinal, SCH-29482, SUN-5555 y FCE-22891 como acetoximetilester de FCE-22101. En cierto sentido se les podría calificar de "AβL malditos", toda vez que problemas de inestabilidad, y otros relacionados con efectos secundarios indeseables, han limitado de manera absoluta su aplicación clínica.

El complejo conocido como ácidos olivánicos, obtenido como producto de la fermentación de *S. olivaceus*, fue el resultado más incipiente de los programas de investigación de inhibidores de βlas, dotados, además, de actividad antimicrobiana amplia⁹⁹. La caracterización de su estructura revela la presencia de un núcleo carbapenem en el que se ha sustituido el azufre del anillo penam por un átomo de carbono. Algo después, en 1978, y partiendo de *S. cattleya*, se encuentran en España en mezclas de fermentación, tienamicina, N-acetil tienamicina y N-acetildehi-

drotienamicina, también con el núcleo carbapenem como estructura central, y un grupo hidroxietil en C₆ que les confiere una gran estabilidad a las β las¹⁰⁰. La investigación de nuevos carbapenems con un grupo hidroxietil en trans dio lugar al desarrollo sucesivo de otros a. olivánicos, tienamicinas semisintéticas, carpetimicinas (*Streptomyces spp.*, 1980), asparenomicinas (*S. tokunononesis* y *S. argenteolus*, 1981), pluracidomicinas (*S. sulfonofaciens*, 1982), y carbapenems de la serie PS (*S. cremeus*, 1984). La inestabilidad química y metabólica y el pobre rendimiento de las vías semisintéticas ha determinado que la mayoría se hayan quedado por el camino, en diferentes fases experimentales.

El imipenem, N-formimidooiltienemicina, resultado de la estabilización de la tienemicina, es un excelente antimicrobiano con amplísimo espectro de actividad¹⁰¹. La presencia del grupo hidroxietil en C₆ posibilita una gran estabilidad frente a la mayoría de las β las, exceptuando algunas de tipo metaloenzima individualizadas en *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Aeromonas* y *Bacteroides*, y en cepas aisladas de *Enterobacter* y *Serratia*. La existencia de un grupo alquiltio en C₂, y su buena penetración a través de la ME dado que es un compuesto zwitteriónico, hacen posible una elevada actividad intrínseca frente a la mayoría de las bacterias gram-negativas, excepto en *Proteus*, y gram-positivas. La hidrólisis por la dehidropeptidasa I renal (DHP I), su elevado poder inductor de β las cromosómicas inducibles, aunque no es selector de cepas con producción desreprimida, y el desarrollo de resistencia en infecciones por *P. aeruginosa*, son los escasos aspectos negativos, que estimularon el desarrollo de otras moléculas relacionadas estructuralmente.

El meropenem, un nuevo carbapenem con excelentes expectativas, difiere de imipenem por disponer de un grupo metil en C₁ que le otorga resistencia a la DPH I, y un grupo dimetilcarbamoilpirrolidintio en C₂ que le confiere mayor actividad intrínseca en gram-negativos¹⁰². Blindas la PBP₂ y además la PBP₃, es tan resistente como el imipenem a todas las β las plasmídicas y peor inductor de β las cromosómicas inducibles. El meropenem es 2/16 veces más activo que imipenem en *Enterobacteriaceae*; 2/4 veces en *P. aeruginosa*; 2/8 veces menos activo en gram-positivos; equiparable en anaerobios; y como imipenem inactivo en *X. maltophilia*, *SAMR* y *E. faecium*. Ofrece una actividad bactericida si-

milar a la del imipenem, aunque más lenta, y tiene mayor efecto postantibiótico en *Enterobacteriaceae*. Los primeros datos farmacocinéticos indican que no parece necesaria la asociación con la cilastatina. LJC 10627 es un nuevo carbapenem también provisto de un grupo metil en C₁ y resistente a la DHP I. Semejante al meropenem, ambos suponen el proyecto más prometedor en el desarrollo de nuevos carbapenems.

4. MEMBRANA EXTERNA Y RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

Los mecanismos de resistencia bacteriana más frecuentes suponen la inactivación del antibiótico después de penetrar en el interior de la célula, y/o la falta de reconocimiento del lugar diana donde ejercen su acción. Existe, además, un mecanismo común a la mayor parte de las bacterias, esencialmente gram-negativas, debido a la existencia de una "membrana extra" en la superficie, denominada membrana externa (ME), que actúa como una barrera de permeabilidad que dificulta y a veces impide la entrada de antimicrobianos al interior de la célula. Este efecto "disminuidor" de la eficacia de los antibióticos se ejerce de forma universal sobre todos los grupos de antimicrobianos. Con relación al amplio grupo de antibióticos betalactámicos (ABL), tal efecto es potenciado por la presencia de betalactamasas (BLA) en el espacio periplásmico con efectiva capacidad hidrolítica del antibiótico. Ambos efectos de barrera, actuando sinérgicamente, dificultan la llegada del ABL a su lugar diana, PBPs, y deben de ser estudiados de forma relacionada.

4.1 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EXTERNA.

Las bacterias gram-negativas están literalmente envueltas por la ME, protección de la que carecen los microorganismos gram-positivos. En su estructura se diferencia una doble capa lipídica que confiere baja permeabilidad tanto a solutos hidrofóbicos, como presumiblemente, también, a compuestos hidrofílicos. En consecuencia, las posibilidades de entrada de nutrientes y la salida de productos secundarios de deshecho, se realiza a expensas de canales inespecíficos formados por proteínas denominadas porinas. Además, algunos microorganismos y en determi-

nadas situaciones, utilizan otras vías de permeabilidad más específicas. Tanto la estructura y funciones de la ME, como las posibilidades de difusión de ABL a través de ella, han sido ampliamente revisados en los últimos años¹⁰³⁻¹⁰⁶.

4.1.1 DOBLE CAPA LIPIDICA.

Como en la mayoría de las membranas biológicas, en la ME bacteriana el componente estructural básico es una doble capa lipídica. De manera diferente a otras membranas usualmente muy permeables a solutos lipofílicos, la ME ofrece una permeabilidad muy baja a sustancias hidrofóbicas¹⁰³. Diversos estudios realizados con microscopía electrónica y con técnicas de modificación y digestión enzimática han demostrado una elevada asimetría para la ME. En su estructura se distinguen dos capas bien diferenciadas: una externa constituida esencialmente por lipopolisacáridos de muy baja permeabilidad, y otra interna, integrada por glicerofosfolípidos más proclives al paso de moléculas hidrofóbicas. Según esta disposición, se puede asumir que la parte externa lipopolisacarídica puede actuar como una barrera de permeabilidad muy efectiva, debido a que las cadenas hidrocarbonadas unidas covalentemente dan lugar a una estructura casi cristalina y mucho menos fluida que la que forman la capa interna de fosfolípidos¹⁰⁷. Además, esta parte exterior de la ME contiene residuos cargados negativamente que determinan una estructura en malla, obstáculo adicional al paso de cationes divalentes¹⁰³.

Que la resistencia bacteriana es debida, en parte, a la ME lo evidencian los estudios de sensibilidad realizados después de que la estructura en doble capa haya sido alterada por modificaciones de su componente lipopolisacarídico. Diversos mutantes de *E. coli* y *S. typhimurium* muestran alteraciones en sus cadenas de lipopolisacáridos, con moléculas de fosfolípidos situados hacia el exterior de la membrana, que confieren mayor permeabilidad para sustancias hidrofóbicas. El resultado, considerando valores de CMI, no difiere mucho del obtenido tras la acción de EDTA que remueve la estructura de la capa de lipopolisacáridos.

4.1.2 PORINAS.

Las bacterias gram-negativas, ante las dificultades de difusión a través de la doble capa lipídica, han establecido vías alternativas poco específicas que facilitan la llegada de los más diversos nutrientes al interior de la célula. Esta difusión inespecífica se efectúa, casi exclusivamente, a expensas de porinas - Omp, outer membrane protein - o proteínas de peso molecular intermedio, PM 30-40.000 D, que forman canales de difusión que contribuyen a incrementar de forma importante la permeabilidad de la ME¹⁰⁸. Los antimicrobianos, muchos de ellos de carácter hidrofóbico, utilizan preferentemente la vía porina para alcanzar el espacio periplásmico. En *E. coli*, la mayoría de ABL llegan al interior de la célula bacteriana a expensas de los canales porina, y otros antibióticos como los aminoglicósidos, tetraciclina y cloranfenicol siguen, en todo o en parte, dicha vía¹⁰⁹.

Las porinas se han estudiado con mayor profundidad en **Enterobacteriaceae** y más concretamente en *E. coli*. Constituyen una de las proteínas más abundantes, 10⁵ copias por célula, y muestran una estructura en forma de trímeros muy estables. En otros microorganismos adoptan la estructura en dímeros e incluso en monómeros. En **Enterobacteriaceae**, con la excepción de los géneros **Proteus**, **Morganella** y **Providencia**, las porinas muestran elevada homología secuencial^{103, 110}. En *E. coli* se han caracterizado dos porinas esenciales, OmpF y OmpC, que forman canales de 1,2 y 1,1 nm respectivamente, y una tercera, Omp PhoE, en medios deficientes en fosfato. En *S. typhimurium* se han descrito OmpF, OmpC y OmpD. Su síntesis es regulada por las condiciones ambientales, osmolaridad y temperatura, cuyas modificaciones favorecen la producción preferente de una sobre las demás. Aunque se trata de canales no específicos, la tasa de penetración esta influenciada por las propiedades fisico-químicas de cada compuesto. El tamaño molecular juega un papel preponderante, y dado el estrecho diámetro de las porinas esenciales incluso el paso de moléculas pequeñas puede entrañar alguna dificultad. En *E. coli*, los canales porina son responsables del 90% de la entrada de los ABL al espacio periplásmico. Su discreto tamaño molecular, inferior a 700 D, y el elevado número de porinas por célula, hace posible la permeabilidad a niveles aceptables.

4.1.3 VIAS ESPECIFICAS ALTERNATIVAS.

La célula bacteriana necesita para su desarrollo de algunos nutrientes que difunden pobremente a través de las porinas. Ante tal situación, las bacterias gram-negativas utilizan vías específicas de difusión para sustancias como las maltodextrinas, la vitamina B₁₂ o complejos de hierro, cuyo tamaño impide el paso por los canales porina¹⁰³. Estas vías son demasiado específicas para permitir la entrada de antimicrobianos al citoplasma, aunque algunos microorganismos como *P. aeruginosa*, que plantean problemas serios de permeabilidad por conductos inespecíficos, sintetizan proteínas que mejoran la permeabilidad para algunos ABL.

4.2 PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.

La permeabilidad de la ME a los antimicrobianos es un fenómeno multifactorial, no solo por las diferentes caminos que la hacen posible, sino también porque intervienen distintos factores: hidrofobicidad, tamaño y carga molecular, de cuya conjunción se derivan las concentraciones alcanzadas en el espacio periplásmico. Las características más relevantes de este fenómeno se han estudiado de forma preferente tomando como modelo *E. coli*¹¹¹.

4.2.1 FACTORES RELATIVOS A LA PERMEABILIDAD.

La hidrofobicidad de cada compuesto es el primero de los factores que intervienen en el grado de permeabilidad. Distintos hechos experimentales han sugerido una relación inversa entre hidrofobicidad y permeabilidad, que influye en sentido negativo en la eficacia de los ABL como antimicrobianos. Zimmermann y Rosselet demuestran tal correlación inversa en *E. coli*, utilizando un método que evalúa de forma combinada la permeabilidad y la hidrólisis enzimática en el espacio periplásmico¹⁰⁹. Niikaido et al. encuentran una correlación similar estudiando la penetración en *E. coli* de diversas cefalosporinas de 1ª generación¹¹². Aplican un método de trabajo que determina el coeficiente de partición etanol/agua como indicador de hidrofobicidad, y afirman que un incremento de 10 veces en el coeficiente

de partición ocasiona una disminución de 5 veces en la tasa de permeación a través de OmpF. Estos resultados fueron confirmados con posterioridad por Yoshimura y Nikaido para penicilinas y cefalosporinas de las tres generaciones, quienes advierten que algunos compuestos no siguen esta norma con fidelidad¹¹¹.

En general, la hidrofobicidad de un ABL parece modificarse en relación con la estructura química, de forma que la sustitución del átomo de azufre en posición 1 por oxígeno - oxicefalosporinas - conlleva menor hidrofobicidad y en consecuencia mayor tasa de penetración a través de la ME¹¹³. Nikaido y Rosemberg ponen de manifiesto ciertas diferencias en la interrelación hidrofobicidad/porinas en *E. coli*¹¹². Demuestran que en estudios con proteolisosomas la hidrofobicidad afecta más a OmpC que a OmpF, tal vez en función del menor diámetro de la primera. Los ensayos con células intactas evidencian, por el contrario, un efecto similar de la hidrofobicidad para ambas porinas. Consideradas como grupo, existe una pequeña diferencia en la hidrofobicidad de penicilinas y cefalosporinas. Aunque diversos datos experimentales sugieren que las penicilinas difunden algo mejor a través de la doble capa lipídica, la generalización es difícil pues es preciso comparar compuestos con radicales idénticos. En este sentido parece que la naturaleza de los sustituyentes es la que determina las diferencias observadas en el análisis comparativo de los diferentes ABL.

En sentido amplio, el tamaño molecular parece tener una influencia decisiva en la penetración de diferentes solutos a través de la ME. No obstante, esta norma de comportamiento tiene menos importancia en relación con los ABL, toda vez que su tamaño molecular, entre 350 y 450 D, es lo suficientemente pequeño para no interferir de forma relevante la entrada al interior de la célula bacteriana¹⁰⁵. De cualquier forma se advierten algunas diferencias cuando se analiza el paso por la ME de nuevos ABL, más voluminosos estereoquímicamente como consecuencia de la adición de radicales mayores. Piperacilina y cefoperazona, difunden marginalmente a través de OmpF como consecuencia de su tamaño inusual. Las cefalosporinas con un grupo oximino, cefuroxima, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona y cef tazidima, también difunden algo peor que lo que correspondería por su hidrofobicidad¹¹¹.

Finalmente, la carga molecular es el último factor a considerar cuando se tratan de determinar los niveles de entrada de los distintos ABL en el espacio intracelular. Yoshimura y Nikaido¹¹¹ en 1985, y Nikaido et al.¹¹⁴ en 1990 establecieron la tasa relativa de difusión a través de OmpF y OmpC en *E. coli*, para diferentes ABL. En general los compuestos zwitteriónicos, ampicilina, cefaloridina, cefalexina, cefpiroma e imipenem, difunden más rápidamente que el resto. Las moléculas monoaniónicas, cefazolina, cefoxitina, ceftizoxima, cefotaxima, ocupan un lugar intermedio en el rango de permeabilidad, y los ABL dianiónicos muestran tasas de difusión inferiores como consecuencia del potencial Donnan negativo.

4.2.2 EFEECTO DE BARRERA Y EFICACIA ANTIMICROBIANA.

La eficacia de un antimicrobiano en su función inhibitoria y bactericida, radica en alcanzar su lugar diana en concentración suficiente y en ser "aceptado" o "reconocido" por ella de manera que pueda desarrollar su acción. Los ABL en absoluto se sus traen a estas premisas y además de requerir concentraciones periplásmicas que posibiliten la inhibición de las PBPs, requieren que estas concentraciones no se vean modificadas por la acción hidrolítica de las β las situadas en dicho espacio periplásmico. Por tanto, la eficacia de los ABL en gram-negativos no está condicionada exclusivamente por la mayor o menor permeabilidad de la ME - "efecto barrera de la ME" - sino que depende de la interrelación entre dicho efecto, el efecto hidrolítico de las β las periplásmicas - efecto barrera de las β las - y la afinidad por las distintas PBPs esenciales de cada microorganismo. Ambos efectos de barrera actúan sinérgicamente y contribuyen a disminuir la eficacia de los ABL.

Si los factores que intervienen en la permeabilidad ya han sido considerados, para poder evaluar el efecto sumatorio de ambos mecanismos conviene precisar que las limitaciones atribuidas a las β las son casi exclusivamente hidrolíticas y no debidas a un fenómeno de obstaculización física del ABL en su camino hacia su lugar diana. En 1983, Sanders emite una imaginativa hipótesis que atribuye la resistencia a los nuevos ABL en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*, a un fenómeno no hidrolítico de "atrapamiento" o "efecto esponja" en el espacio periplásmico¹¹⁵. Se-

gún esta teoría, las moléculas de antibiótico son bloqueadas por el elevado número de moléculas de β la existentes como consecuencia de la hiperproducción enzimática ocurrida después de la desrepresión. Aunque posteriormente analizaremos más ampliamente la resistencia por β las, conviene precisar aquí que tal efecto, aunque posible en situaciones concretas, no es decisivo en la resistencia. Estudios posteriores pusieron luz sobre aspectos no tenidos en cuenta en los trabajos inciales. Por una parte no se evaluó la hidrólisis enzimática a bajas concentraciones, similares a las que se alcanzan en el espacio periplásmico. Por otro lado se atribuyó una resistencia absoluta de los nuevos ABL a la β las cromosómicas inducibles, que en mayor o menor grado son capaces de hidrolizar la mayoría de los ABL. Vu y Nikaido en 1985, después de efectuar un análisis cuantitativo del fenómeno en *E. cloacae*, muestran que el "trapping" periplásmico da lugar a niveles de resistencia extremadamente bajos, mientras que la hidrólisis enzimática explica el elevado nivel de resistencia¹¹⁶.

4.2.3 ESTIMACION CUANTITATIVA DEL EFECTO DE BARRERA.

La relevancia que la ME tiene en el paso de los ABL al citoplasma bacteriano es difícil de cuantificar en términos absolutos. Los ABL no pueden clasificarse de manera tajante en dos grupos: capaces e incapaces de pasar. Para comprender bien el "efecto barrera de la ME" es preciso estimar en valores cuantificables las tasas de difusión de cada fármaco a través de la misma. Habitualmente estas tasas son expresadas como coeficientes de permeabilidad, parámetros que dificultan la formación de una idea real de la magnitud de la difusión¹⁰⁶. Por ello, parece más conveniente transformar los coeficientes en tiempo medio de equilibrio ($t_{1/2}$), que corresponde al tiempo requerido para que en el espacio periplásmico se alcance una concentración de antibiótico igual a la mitad de la concentración externa, asumiendo que no hay degradación enzimática posterior y que la membrana citoplásmica es completamente permeable^{104, 113}.

Para ABL que muestran un $t_{1/2}$ elevado, la entrada en el espacio periplásmico será baja y la efectividad antimicrobiana de poco valor. Para compuestos cuyos valores de $t_{1/2}$ reflejen una rápida penetración la efectividad será potencialmente elevada. Los

valores definitivos de la efectividad vendrán condicionados por la posibilidad de hidrólisis una vez atravesada la ME, dado que ambas barreras deben ser soslayadas de forma sucesiva por su proximidad. En el primer caso, la efectividad solo empeorará discretamente si además de baja permeabilidad existe hidrólisis enzimática; en el segundo, la efectividad dependerá de la magnitud de la inactivación por *β*las. Para la mayoría de los ABL, el factor decisivo en su eficacia como antimicrobianos no radica en la tasa absoluta de penetración a través de la ME, sino en el balance entre la misma y el resultado de la potencial hidrólisis enzimática en el espacio periplásmico, asumiendo la inexistencia de falta de afinidad por las PBPs.

La estimación cuantitativa del efecto de barrera ha sido estudiada con amplitud en relación con los ABL, por la posibilidad de evaluar con fiabilidad la actividad hidrolítica en el espacio periplásmico. Zimmerman y Rosselet¹⁰⁹ y Sawai et al.¹¹⁷, en 1977, propusieron modelos equiparables en los que asumen la existencia de difusión simple a través de la ME y que la hidrólisis por *β*las en el espacio periplásmico obedece la cinética de Michaelis-Menten. Posteriormente, Nikaido y Normak¹¹⁸ en 1987, analizan la validez de estos modelos determinando la concentración externa de ABL que da lugar a una concentración periplásmica capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre las PBPs en *E. coli*. En síntesis, ratifican la interdependencia y la sinergia entre ambos efectos de barrera y afirman que la disminución de la permeabilidad de la ME no incrementa sustancialmente las CMIs de los ABL si el antibiótico no es hidrolizado, o incluso si tal hidrólisis es baja o lenta. Por el contrario, una inactivación significativa del ABL afectaría de forma relevante la efectividad final, si además existe disminución de la permeabilidad que motive concentraciones periplásmicas más bajas.

La probabilidad de que una molécula de ABL alcance su diana de manera eficaz, debe ser proporcional al producto de la probabilidad de su paso a través de la ME y la probabilidad de no ser hidrolizada en el espacio periplásmico. Nikaido y Normak, expresan matemáticamente tal probabilidad, definiendo el "target access index" (TAI), índice numérico de la probabilidad de que un ABL alcance en concentración suficiente sus PBPs diana después de atravesar con éxito ambas barreras¹¹⁸.

$$TAI = P.A. \cdot V_{max} / (K_m + C_{inh})^{-1}$$

El valor P.A. indica la probabilidad de difusión a través de la ME, mientras que el cociente $V_{max} / (K_m + C_{inh})^{-1}$ está inversamente relacionado con la tasa de hidrólisis a la concentración de ABL necesaria para inhibir la diana. En esta expresión V_{max} y K_m son, respectivamente, la tasa de hidrólisis y la constante de afinidad de la β la, y C_{inh} la constante de inhibición de PBPs.

La determinación de la máxima hidrólisis enzimática (V_{max}) y de la constante de afinidad (K_m), deben efectuarse en condiciones que remeden las verosimilmente alcanzadas en el espacio periplásmico. La afinidad de una β la por los diferentes substratos betalactámicos puede variar ampliamente entre 0,05 y 30.000 μ M, de manera que un sólo valor de K_m determinado con una concentración única de ABL, no indica la especificidad y afinidad real del enzima. Por ello es imperativo, sobre todo, trabajar con concentraciones bajas de substrato (0,1mM), similares a las que se obtienen en el espacio periplásmico. Si estas concentraciones son alcanzadas varias veces y no hay hidrólisis efectiva, la eficacia del ABL está mucho más garantizada^{116, 119}.

La interrelación simple entre el índice numérico TAI y la concentración de un ABL que inhibe un microorganismo fué establecida por Nikaido y Normak¹¹⁸. Una sencilla ecuación permite predecir la CMI, con poco margen de error sobre el valor experimental, conociendo la permeabilidad de la ME para un determinado ABL y su sensibilidad a una β la, dado que el parámetro C_{inh} es constante para cada ABL:

$$CMI = (TAI^{-1} + 1) C_{inh}$$

Aplicando esta fórmula, Nikaido y Normak calculan las CMIs de 13 ABL frente a 5 cepas de *E. coli* con un índice de predicción del 78%¹¹⁸. Recientemente, Frere, propone un procedimiento para el cálculo de estos parámetros con el que predice correctamente la CMI en 61 de 65 casos¹²⁰. De acuerdo con estos planteamientos matemáticos, los valores de TAI muy superiores a 1 no tienen apenas influencia en la CMI. Por el contrario, cuando dichos valores sean notablemente inferiores a 1, una disminución

importante de la permeabilidad afectará, incrementándola, la CMI. Esta situación tiene lugar cuando la inactivación enzimática del ABL es muy superior a su tasa de penetración a través de la ME, y aún en este caso el incremento de la CMI suele ser inferior al calculado teóricamente, debido a la posibilidad de paso a través de otras vías específicas diferentes de las porinas. Todas estas consideraciones ratifican la dificultad de aventurar hipótesis sobre problemas relacionados con la permeabilidad, en base a incrementos de la CMI.

4.2.4 PERMEABILIDAD EN BACILOS GRAM-NEGATIVOS.

Todos los aspectos referentes a la permeabilidad de la ME han sido estudiados, preferentemente, en *E. coli*. Con algunas excepciones, en el resto de *Enterobacteriaceae* la situación no es muy diferente. En *S. typhimurium* LT₂ y *E. cloacae* se han caracterizado tres porinas, OmpF, OmpC y OmpD, y como en *E. coli* OmpF da lugar a canales más anchos que OmpC^{105, 121}. En *E. cloacae* y en medios de baja osmolaridad, OmpF es la porina responsable de la entrada de ABL de manera similar a lo descrito para *E. coli*. En medios hiperosmolares la producción de OmpF está completamente reprimida y, a diferencia de *E. coli*, la síntesis de Omp C no se incrementa significativamente.

Remedando a *E. coli*, en *K. pneumoniae* y *E. cloacae* se han descrito mutantes deficientes en porinas que muestran resistencia moderada a cefalosporinas y otros ABL¹²²⁻¹²⁴. En *S. marcescens* y de manera contumaz en el curso o después del tratamiento con ABL, se han aislado cepas con porinas alteradas o modificadas en su nivel de producción, que analizaremos posteriormente de forma más detallada¹²⁵⁻¹²⁷. En microorganismos del género *Proteus*, así como en *Morganella* y *Providencia*, parece demostrada la producción de una sola proteína esencial¹¹⁰. En estas especies, también se han caracterizado mutantes deficientes en porinas, seleccionadas por su bajo nivel de resistencia a cefoxitina¹¹⁰.

Con respecto a los BGNNF, y en concreto en relación con *P. aeruginosa*, se ha mantenido durante mucho tiempo la hipótesis de que la elevada resistencia intrínseca a los antimicrobianos era debida a la baja permeabilidad de su ME. Nikaido y Hancock de-

demuestran experimentalmente este supuesto, ratificando estudios previos de otros autores que demostraban que la permeabilidad de la ME de *P. aeruginosa* es 100-500 veces inferior a la de *E. coli*¹²⁸. La situación no es muy diferente en otros microorganismos próximos, *P. cepacia* y *A. faecalis*, en los que se ha demostrado la existencia de porinas de pequeño diámetro funcional que justifican su elevada resistencia intrínseca a la mayor parte de los antimicrobianos¹²⁹.

En 1983, Yoshimura et al. caracterizan una proteína esencial en *P. aeruginosa*, denominada proteína F, cuyo amplio diámetro (2µm) no se correlaciona bien con el bajo coeficiente de permeabilidad de su ME¹³⁰. Sugieren que solamente una pequeña fracción de sus porinas forman canales abiertos útiles para la entrada de solutos, de manera que la mayor parte de los canales porina están cerrados o no son funcionales fisiológicamente. Como contrapartida positiva, dado el diámetro de estas porinas, las tasas de difusión a través de los escasos canales funcionales se ven poco afectadas por modificaciones en la carga, tamaño molecular o hidrofobicidad. Esta indiferencia relativa a las propiedades estructurales de los solutos, evidencian que la proteína F es responsable de la entrada de la mayoría de los ABL y probablemente de la mayoría de los antimicrobianos.

La existencia de vías más específicas para la entrada de ABL en *P. aeruginosa* se sugirió antaño, ante la escasa operatividad funcional de las porinas. Livermore et al. revelan que la ausencia de correlación entre las CMIs de imipenem y las de otros ABL en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem, sugiere que éste atraviesa la ME por vía diferente que el resto de ABL¹³¹. Quinn et al. demuestran que varias cepas de *P. aeruginosa* de procedencia clínica, moderadamente resistentes a imipenem pero no a otros ABL sin alteraciones en cuanto a β las y PBPs, carecen de una proteína de membrana de 45.000 D¹³². Büscher et al. aíslan mutantes similares de *P. aeruginosa* y sugieren que esta proteína puede tratarse de las denominadas D₁ o D₂ involucradas en la permeabilidad de este microorganismo¹³³. Hoy parece comprobado que imipenem y meropenem, utilizan otras vías alternativas, proteínas D₁ y D₂, para conseguir niveles efectivos en el espacio periplásmico, pero que la ausencia de D₂ es la responsable específica de la resistencia¹³⁴⁻¹³⁶.

4.3 RESISTENCIA Y PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.

La resistencia ofrecida por la ME al paso de los ABL puede plantearse bajo prismas diferentes. Inicialmente, consideraremos aspectos referentes a las dificultades naturales de distintos antimicrobianos motivadas por sus características estructurales y por las peculiaridades de la propia membrana. En segundo término, es preciso detenerse en el análisis de la resistencia motivada por mutaciones y alteraciones que afectan a las tres vías habituales de entrada de antimicrobianos y otros solutos al interior de la célula bacteriana.

4.3.1 RESISTENCIA INTRINSECA.

Las bacterias gram-negativas muestran, en mayor o menor grado, cierta resistencia a los antimicrobianos motivada por las características de su ME. Se trata de una dificultad natural, propia o fisiológica, pero en ningún caso adquirida como consecuencia de cambios o mutaciones genéticas. Las sustancias hidrofóbicas no pueden difundir fácilmente a través de la ME. La parte externa de la doble capa lipídica, compuesta por lipopolisacáridos, tiene una baja permeabilidad natural que dificulta mucho el paso de solutos hidrofóbicos^{103,112}. Por este motivo la mayoría de las bacterias gram-negativas son resistentes a antibióticos muy hidrofóbicos activos en gram-positivos, tales como los macrólidos y la novobiocina. La resistencia debida a la hidrofobicidad decrece drásticamente cuando se modifica la estructura de la ME por agentes físicos, elementos catiónicos, o por mutación^{105,137}.

El carácter hidrofílico de muchos antimicrobianos permite una difusión valorable a expensas de las porinas, que contribuye a su sensibilidad a ABL, aminoglicósidos, tetraciclinas y cloranfenicol. En *Enterobacter* y *Serratia*, el estrecho diámetro de los canales porina determina resistencia intrínseca a distintos antibióticos¹⁰⁵. En *P. aeruginosa*, sólo una pequeña fracción de los canales de proteína F forman poros abiertos, lo que determina resistencia natural a muchos ABL. En BGNNF, la baja difusión al espacio periplásmico y la inactivación por las cromosómicas inducibles son los determinantes mayores de la resistencia a ABL.

4.3.2 MUTACIONES QUE AFECTAN A LA DOBLE CAPA LIPIDICA.

Alteraciones mutacionales en la región lipopolisacáridica o en la capa interna de fosfolípidos, originan resistencia a algunos antimicrobianos en los que la contribución de esta doble capa a la permeabilidad es de mayor relevancia. Godfrey et al. han descrito mutantes de *P. aeruginosa* resistentes a ABL por alteraciones en la estructura de lipopolisacáridos¹³⁸. Puede tratarse de una mutación pleiotrópica que afecte a más de una vía de entrada, aunque en este microorganismo la permeabilidad por porinas está considerablemente disminuida. En *P. aeruginosa* la entrada de aminoglicósidos tiene lugar como consecuencia de modificaciones en la doble capa lipídica. Nikaido y Hancock refieren mutantes resistentes en los que no tiene lugar la desorganización de la doble capa inducida por aminoglicósidos¹²⁸.

4.3.3 MUTANTES DEFICIENTES EN PORINAS.

A lo largo de los últimos 10 años se han aislado, inicialmente en el laboratorio y después de muestras clínicas, mutantes deficientes en porinas resistentes a ABL. Al ser las porinas el camino usual por el que transitan estos antibióticos, la presencia de mutantes es la causa más frecuente de resistencia adquirida.

Harder et al. aislan en 1981, mutantes espontáneas de *E. coli* K12 con resistencia moderada a carbenicilina y deficientes en OmpF¹³⁹. Aunque estas cepas conservan su permeabilidad a expensas de OmpC, sus canales de inferior diámetro determinan CMIs discretamente más elevadas para ABL que penetran más lentamente. Jaffé et al. refieren mutantes similares de *E. coli* K12 deficientes en OmpF y OmpC, cuyos valores de CMI para distintos ABL son más elevados como corresponde a mutaciones que afectan la producción de ambas porinas esenciales¹⁴⁰. Komatsu et al. obtienen un mutante de *E. coli* K12 con resistencia incrementada a moxalactam, CMIs de 0,1 y 12,8 ug/ml en la cepa normal y el mutante respectivamente, que mantiene la sensibilidad a otros ABL incluyendo ampicilina¹⁴¹. Mientras que la afinidad por PBPs y la producción de β la no cambian, la penetración a través de la ME para moxalactam, está notablemente alterada como consecuencia de modificaciones en las proteínas de membrana, objeti-

vandose una reducción importante de una de las porinas. Sawai et al. en 1982, consiguen mutantes de *E. coli*, *P. mirabilis* y *E. cloacae*, con permeabilidad alterada como consecuencia de la pérdida de proteínas de membrana, que ocasionan elevaciones de la CMI particularmente relevantes para cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, incluyendo cefoxitina¹²². En resumen, prácticamente en todas las *Enterobacteriaceae*, y tanto en relación con ABL como respecto a otros antimicrobianos, aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y quinolonas, se han descrito mutantes de laboratorio deficientes en porinas^{110, 122, 141-146}.

Como consecuencia del uso clínico de ABL, en el curso del tratamiento se han aislado mutantes resistentes deficientes en porinas. Nikaido atribuye las todavía escasas referencias a aislamientos de este tipo, a la desventaja en que se encuentran estas cepas en sus nichos ecológicos en relación con sus cepas progenitoras, y a la tecnología más compleja precisa para su caracterización, no disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos¹⁰⁵.

Goldstein et al. aislan en 1983, durante un episodio de bacteriemia tratado con cefotaxima y amicacina, mutantes de *S. marcescens* de baja permeabilidad, como consecuencia de la ausencia casi absoluta de una proteína de membrana de 41.000 D¹²⁵. Las concentraciones de ABL y aminoglicósidos requeridas para su inhibición son 8-64 veces superiores a las que precisan las cepas originales. Guttmann y Chabbert caracterizan, en 1984, mutantes de permeabilidad en *S. marcescens* aisladas a lo largo del tratamiento con moxalactam¹²⁶. De nuevo se objetiva la disminución en la síntesis de una proteína de membrana de 41.000 D, que motiva elevaciones de la CMI entre 8 y 16 diluciones para casi todos los ABL estudiados. Sanders y Watanakunakorn describen una cepa de *S. marcescens* defectiva en una proteína de membrana de 42.000 D, que desarrolla resistencia a ABL y aminoglicósidos durante el tratamiento con ticarcilina, cefazolina, gentamicina y tobramicina¹⁴⁷. Como vemos, el aislamiento de mutantes de permeabilidad deficientes en porinas parece especialmente frecuente en *Serratia*. Nikaido, sustenta una hipótesis que descansa en las dificultades de desarrollo de este microorganismo frente a los nuevos ABL a expensas de la hiperproducción de β la cromosómica inducible, que muestra baja afinidad por los nuevos ABL¹⁰⁵. Estas dificultades de supervivencia motivarían el desarrollo de mutantes de permeabilidad.

En otras **Enterobacteriaceae** también se han descrito mutantes deficientes en porinas obtenidas de muestras clínicas. Medeiros et al. encuentran una cepa de **S. typhimurium** deficiente en OmpC, seleccionada durante el tratamiento con cefalexina¹²¹. Bakken et al. refieren el hallazgo de un mutante de **E. coli** obtenido en el tratamiento con ceftazidima, que muestra disminución de OmpC y OmpA¹⁴⁸. Sorprendentemente, en esta cepa el ácido clavulánico induce la producción de ambas porinas restituyendo en parte la permeabilidad. La cepa muestra CMIs incrementadas 100 y 8 veces con respecto al aislamiento inicial para ceftazidima y ceftriaxona respectivamente, mientras que la actividad de otros ABL no sufre modificaciones apreciables.

Desde 1978, se ha suscitado la posibilidad de que la disminución de la producción de porinas esenciales esté relacionada con plásmidos de resistencia. Yyer et al. refieren alteraciones en la síntesis de proteínas de membrana en **E. coli** asociadas a la presencia del plásmido rRM98¹⁴⁹. Rossouw y Rowbury relacionan la ausencia de OmpF en **E. coli** con la presencia del plásmido R124¹⁵⁰. No hemos encontrado en la literatura referencias más actuales, que atribuyan la resistencia por impermeabilidad a genes plasmídicos. Indudablemente, la posibilidad de un mecanismo de transmisión plasmídica que afectara el paso de antimicrobianos por la ME, ensombrecería el panorama de la resistencia a ABL.

4.3.4 MUTANTES PLEIOTROPICOS.

El nivel de resistencia conferido como consecuencia de mutaciones que determinan déficit de alguna proteína de membrana no es muy elevado, habitualmente, sino se complementa con la hidrólisis enzimática. Además, puede afectar a grupos concretos de antimicrobianos, sin que necesariamente suponga resistencia cruzada entre antibióticos no relacionados estructuralmente.

En ocasiones, se han aislado mutantes con un fenotipo de resistencia amplio que incluye además de ABL, aminoglicósidos y nuevas fluorquinolonas. Esta resistencia es difícil de atribuir a una sola causa individualizada para cada grupo de antimicrobianos y sugiere, más bien, la existencia de una mutación reguladora que ocasiona resistencia debida a alteraciones pleiotrópi-

cas, entre las que se incluye la expresión disminuida de OmpF. El fenómeno no está exento de cierta confusión, no obstante distintos casos de resistencia múltiple asociados con disminución de la producción de porinas, pueden explicarse más fácilmente si se atribuyen a mutaciones pleiotrópicas que afectan a grupos de antimicrobianos no relacionados estructuralmente^{105,-106}.

Tanto en *Enterobacteriaceae* como en *P. aeruginosa*, se han descrito mutantes pleiotrópicos con afectación de la sensibilidad a los ABL y otros antimicrobianos. Están caracterizadas mutantes deficientes en porinas en cepas de *Kebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Serratia*, con resistencia a múltiples antibióticos incluyendo ABL, aminoglicósidos, quinolonas, trimetoprim y clo-ranfenicol, debida a mutaciones en un gen regulador pleiotrópico^{105,143,144,147}. También en *P. aeruginosa* se han aislado mutantes con resistencia múltiple, en los que es verosímil pensar en la existencia de alteraciones de esta índole^{151,152}.

4.3.5 MUTANTES DE VIAS ESPECIFICAS.

Algunos microorganismos gram-negativos poseen vías alternativas específicas para la entrada de nutrientes que no pueden pasar al citoplasma a través de las porinas. El concepto de transporte específico ha sido sugerido y demostrado para diversos antimicrobianos en relación, sobre todo, con BGNNF. No obstante, esta "entrada de contrabando", apelativo debido a Nikaido, se ve distorsionada por mutaciones que conllevan la pérdida de proteínas específicas de transporte.

La entrada de ABL en *P. aeruginosa* se efectúa a expensas de la proteína F y de otras proteínas específicas D₁ y D₂. La resistencia a carbenicilina, ureidopenicilinas y ceftazidima pero no a imipenem, en la que no median mecanismos hidrolíticos ni de falta de afinidad, se relaciona con la proteína F y una mayor proporción de poros de pequeño diámetro. La resistencia a imipenem, en ocasiones cruzada con meropenem, es debida a mutaciones que determinan la pérdida de la proteína D₂ de aproximadamente 45.000 D, que permite el paso cuantitativamente más importante del antibiótico al interior de la célula¹³²⁻¹³⁶. Este fenómeno tiene singular trascendencia en la utilización clínica

de imipenem y verosimilmente de otros nuevos carbapenems, en infecciones por *P. aeruginosa*. Está demostrado que el desarrollo de resistencia "in vivo" a imipenem en *P. aeruginosa* alcanza cifras del 25% del total de tratamientos¹⁵³. Este hecho es relevante dado que imipenem es resistente a la mayor parte de los mecanismos hidrolíticos, cromosómicos o plasmídicos, por *β*las. De nuevo, se pone en evidencia la respuesta del mundo microbiano ante la presión selectiva ejercida por antimicrobianos diseñados para obviar los mecanismos de resistencia más comunes.

5. PBPs Y RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

5.1 ASPECTOS ESENCIALES.

El descubrimiento de la penicilina G a finales de la década de los años 20 no solamente es un hecho de enorme trascendencia terapéutica. También, abre el camino de la investigación básica en los aspectos moleculares de la estructura bacteriana y su relación con los mecanismos por los que los antimicrobianos ejercen su acción. El interés por la forma en la que la penicilina inhibía el crecimiento bacteriano comienza de manera inmediata al hallazgo de Fleming y se intensifica en los años posteriores. En ese periodo inicial, tres observaciones fundamentales revelan la complejidad del problema y suscitan enormes expectativas¹⁵⁴.

Los estudios morfológicos de Gardner en 1940, ponen de manifiesto que las concentraciones bajas de penicilina inducen la filamentación de *E. coli*, con formación de abultamientos o protuberancias y posterior lisis al trabajar con concentraciones elevadas de antibiótico¹⁵⁵. Duguid, en 1946, cuando no se había descubierto la existencia de la pared celular (PC), afirma que la penicilina interfiere con la síntesis de alguna estructura superficial de la célula bacteriana¹⁵⁶. En 1956, Cooper, resumiendo los trabajos previos de diversos autores, revela que la penicilina G radiactiva se une a la membrana celular citoplásmica (MC), relacionando este hecho con el mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos (ABL)¹⁵⁷.

Posteriormente y de manera progresiva, una serie de hallazgos concatenados cimientan el estado actual de conocimientos sobre

la estructura bacteriana y sobre el mecanismo de acción de la penicilina y otros ABL que sucesivamente se fueron desarrollando. En 1952, Park demuestra que el peptidoglicano es el componente básico y esencial de la PC y que su precursor es un uridin-nucleótido¹⁵⁸. Más tarde se dilucida su estructura química y se determinan las fases de su biosíntesis¹⁵⁹. Con todo, esta etapa inicial alcanza su punto más relevante al identificarse las "peptidoglicano transpeptidasas" como dianas letales de los ABL¹⁶⁰. Estas enzimas, presentes en la MC de la mayoría de las bacterias, son denominadas PBPs - Penicillin-Binding Proteins - por su habilidad para unirse covalente e irreversiblemente a la penicilina. Contribuyen de una parte a la síntesis de la PC y por otro lado son dianas letales y base del mecanismo de acción de los ABL. Su hallazgo fué definitivo para la profundización en ambos procesos, de manera que de forma ininterrumpida se han ido planteando interrogantes y cuestiones diferentes, que han consolidado el estado actual de conocimientos. Algunas de estas cuestiones son:

- ¿Cuántas PBPs distintas integran la dotación enzimática de la MC y en que aspectos son diferentes unas de otras?
- ¿Cuál son las funciones de las múltiples PBPs en la síntesis de la PC y que implicaciones tienen en la fisiología bacteriana?
- ¿Las reacciones de transpetidación y carboxipeptidación, fundamentales en la síntesis del peptidoglicano, figuran entre las catalizadas por las PBPs?
- ¿Todas las PBPs son esenciales para la viabilidad celular y en que medida contribuyen a la diferenciación morfológica que tiene lugar?
- ¿Todas las PBPs son esenciales para la viabilidad celular y en que medida contribuyen a la diferenciación morfológica que tiene lugar?
- ¿Existen otras proteínas sensibles a la penicilina sin misión específica en la síntesis de la PC?
- ¿Todas las PBPs son esenciales para la viabilidad celular y

en que medida contribuyen a la diferenciación morfológica que tiene lugar?

- ¿Existen otras proteínas sensibles a la penicilina sin misión específica en la síntesis de la PC?
- ¿Cual es el mecanismo preciso por el que los ABL ejercen su efecto inhibitorio y bactericida, y en que modo se efectua la unión PBPs-ABL?
- De todas las PBPs caracterizadas, ¿cuales son dianas letales para los diferentes ABL?
- ¿Son, realmente, los ABL substratos análogos de algún componente del peptidoglicano?
- ¿Que relación evolutiva existe entre las PBPs de bacterias no relacionadas taxonómicamente?
- ¿Que interrelación existe entre PBPs y betalactamasas (βlas)?

El arduo trabajo de muchos investigadores ha permitido resolver, a lo largo de los últimos 20 años, muchas de las cuestiones planteadas. Sobre el tema se han publicado magníficas revisiones que resumen "el estado del arte" en el momento actual y profundizan en la contribución de las PBPs a la resistencia bacteriana a ABL^{154, 161-169}.

5.2 PARED CELULAR Y MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

En las últimas dos décadas, el compendio de conocimientos relacionados con la PC, su biosíntesis, y las enzimas que intervienen y la controlan, se ha enriquecido de forma considerable. Actualmente disponemos de excelentes artículos de revisión, que permiten comprender los aspectos relacionados con su estructura, síntesis y funciones¹⁷⁰⁻¹⁷².

La PC es una estructura externa a la MC que envuelve a la célula confiriéndole rigidez y protección. En microorganismos gram-positivos la PC está formada por varias capas finas y constitu-

ye la estructura externa de la célula, si exceptuamos la cápsula en las bacterias que la posean. En gram-negativos, la PC es una capa única situada, en sentido figurado, entre la ME y la MC. El componente fundamental de la PC es el peptidoglicano, común a todas las bacterias, en cuya síntesis interfieren los ABL. Consiste de bandas lineales de polisacáridos unidos y entrecruzados por medio de péptidos de cadena corta. El polisacárido como tal, está constituido por moléculas unidas y alternantes de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico a cuyo grupo lactil se une un péptido de 5 aminoácidos en el que alternan estereoisómeros D y L. La composición del pentapéptido es equivalente en todas las bacterias y solamente el aminoácido situado en posición 3 varía de una especie a otra, mientras que los dos últimos aminoácidos son siempre D-alanina. En ocasiones, un péptido ramificado de composición variable está localizado en el tercer aminoácido. En gram-negativos, el peptidoglicano está unido a las lipoproteínas de la ME formando un complejo que va a caracterizar sus relaciones con el medio ambiente exterior. En bacterias gram-positivas se une covalentemente a otros polímeros, como los ácidos teicoicos, dando lugar a una estructura más gruesa y permeable que permite, con más facilidad, la entrada de ABL y otros antimicrobianos como bacitracina y vancomicina.

La síntesis de la PC es un fenómeno complejo, cuya secuencia de acontecimientos y reacciones no está establecida con precisión. En un intento de simplificación se pueden distinguir tres etapas diferentes¹⁷¹. La fase inicial tiene lugar en el citoplasma bacteriano con la síntesis de un pentapéptido UDP-N-acetilmurámico, como resultado de la adición de D-alanina-D-alanina como dipéptido presintetizado proveniente del substrato donante por transpetidación. La segunda etapa se desarrolla en la parte más interna de la MC e incluye sucesivamente, transferencia de ácido fosfo-N-acetil murámico, adición de N-acetil glucosamina, y modificaciones específicas de especie con incorporación y entrecruzamiento de aminoácidos y formación de enlaces amida a expensas de grupos amino libres. La última fase comienza con la polimerización del peptidoglicano mediante reacciones de transglicosilación y adición de subunidades disacárido-péptido. Esta última fase finaliza con la acción catalítica de transpeptidasas y carboxipeptidasas, y la unión covalente de otros polímeros.

Las PBPs pueden catalizar más de una reacción específica en la síntesis del peptidoglicano y funcionar de manera intercambiada, aunque alguna de ellas, sin embargo, desempeñan funciones únicas y esenciales requeridas para el crecimiento celular¹⁷³. Ejercen su acción enzimática a nivel del enlace D-alanil-D-alanina situado en la posición 4-5 del pentapeptido. Los enzimas con acción carboxipeptidasa hidrolizan este enlace, por el contrario los que desarrollan una acción específica transpeptidasa unen entrecruzando dos péptidos contiguos, y la ruptura entre péptidos previamente entrecruzados es misión desempeñada por enzimas con actividad endopeptidasa. Mientras que el papel fisiológico de las transpeptidasas está bien establecido, el de las carboxipeptidasas y endopeptidasas está por determinar definitivamente.

Sin duda, la transpeptidación es la reacción fundamental, puesto que entrecruzando subunidades del peptidoglicano da lugar a una tupida red o malla que infiere longitud e integridad a la PC. En principio, el enzima cataliza la hidrólisis del enlace D-alanil-D-alanina entre 4 y 5 reemplazando al residuo terminal alanina en el pentapéptido. Después, el penúltimo grupo alanina situado en posición 4 de la cadena y unido a la PBP, actúa como aceptor de un grupo amino del aminoácido en 3 del péptido contiguo, promoviendo de esta forma el entrecruzamiento peptídico. En la fase final, la PBP se regenera y queda libre y potencialmente activa para repetir de nuevo el proceso. Estas reacciones originan modificaciones estructurales que señalan lugares específicos en la PC, tanto en la septación como en el proceso de división celular.

Si la secuencia de reacciones que se desarrollan en la síntesis de la PC celular no está definitivamente establecida, mucho menos lo está el mecanismo por el que la penicilina y demás ABL ejercen su acción antimicrobiana. Con anterioridad hemos comentado la sospecha, muy inicial en el tiempo, de que la penicilina ejercía su acción interfiriendo con la síntesis de alguna estructura superficial de la célula. De forma más concluyente, el mecanismo de acción de los ABL fué postulado en 1965 por Tipper y Strominger, considerando una reacción en dos fases en la que está involucrado un acil-enzima intermedio¹⁶⁰. La penicilina se une covalentemente al lugar activo del enzima mediante una reacción no reversible bajo condiciones fisiológicas. Se

origina un complejo inactivo peniciloil-enzima, análogo del acil-enzima formado en la síntesis del peptidoglicano, que impide el entrecruzamiento peptídico inhibiendo la síntesis del peptidoglicano y la estructuración de la PC^{174,175}. La lisis y muerte celular posteriores no son un proceso pasivo, sino el resultado de la degradación de la PC por enzimas-autolisinas. Las PBPs de forma directa o indirectamente pueden ser las desencadenantes del proceso autolítico¹⁷⁶.

En la tesis de los autores citados se observa una similitud con la reacción de transpeptidación precisa para la síntesis de la PC. En efecto, la interacción de una transpeptidasa y un sustrato donante acil-D-alanil-D-alanina da lugar a la formación de un acil-D-alanil-enzima intermedio, con posterior liberación de D-alanina y transferencia del acil-D-alanil residual al grupo amino libre de un sustrato aceptor. Se ha propuesto que la penicilina acila la enzima, inhibiendo la transpeptidación, impidiendo la síntesis de la PC y provocando la muerte celular. De esta forma los ABL interferirían con la biosíntesis de la PC al actuar como análogos de la molécula D-alanil-D-alanina del pentapéptido, sustrato natural de las PBPs¹⁵⁴. En esta analogía radica la afinidad de los ABL por el lugar catalítico del enzima. De hecho existe evidente similitud estereoquímica entre la estructura básica de los ABL y la del acil-D-alanil-D-alanina del pentapéptido, de tal forma que el enlace amida del anillo betalactámico es reconocido por la PBP como similar al enlace amida del pentapéptido. En cierto sentido, no parece muy exagerada la afirmación de que la penicilina y otros ABL "engañan a las bacterias".

5.3 CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LAS PBPs.

Desde que Cooper¹⁵⁷, en 1956, demostró que la penicilina G marcada con S³⁵ era capaz de unirse mediante enlace covalente a un número determinado de "sitios" en la MC, se ha avanzado considerablemente en la comprensión de las características y funciones de las PBPs. Con raras excepciones, como *Mycoplasma* y halobacterias, todas las eubacterias estudiadas contienen en su membrana PBPs, entre 1.000 y 10.000 moléculas por célula, que suponen aproximadamente el 1% del total de las proteínas de membrana. El número de PBPs diferentes caracterizadas en cada microorganismo oscila entre 3 y 9, de manera que a mayor com-

plejidad celular, mayor es el nº de PBPs distintas presentes en la membrana.

La técnica descrita por Spratt y Pardee en 1975 y modificaciones posteriores de la misma, han permitido la separación y el análisis de las diferentes PBPs en distintos microorganismos¹⁷⁵. Las proteínas son detectadas y cuantificadas mediante la incubación de membranas bacterianas con penicilina G marcada con C¹⁶⁷. Después de la desnaturalización inmediata con detergentes iónicos, que estabilizan el complejo peniciloil-PBP y previenen la fragmentación e hidrólisis enzimática, las distintas proteínas son separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil-sulfonato sódico, y visualizadas por técnicas fluorográficas.

Para su identificación y reconocimiento en cada bacteria, las PBPs son numeradas en orden decreciente de PM, que varía entre 140.000 y 40.000 D, aunque en ocasiones se ha detectado alguna proteína de menor tamaño. De esta forma las proteínas con mayor PM reciben un nº de orden más bajo, mientras que a aquellas PBPs relacionadas, con tamaño similar, se les asigna el mismo número ordinal y se les diferencia por una letra. Conviene señalar la ausencia de relación física y funcional entre PBPs que reciben el mismo nº en microorganismos alejados en su clasificación taxonómica. Utilizando como modelo *E. coli* se ha estudiado, el nº de PBPs y sus funciones fisiológicas en la división celular, en el mantenimiento de la morfología y aspecto, y su interrelación con los diferentes ABL. En *E. coli* se han caracterizado entre 6 y 9 PBPs diferentes, aunque el nº más usual es 7 (30,31b), numeradas por Spratt del 1 al 6¹⁷³. El PM oscila entre 96.000 y 40.000 y son codificadas por genes distintos dispersos en el cromosoma.

La delimitación de funciones para cada PBP se ha conseguido por diferentes procedimientos que incluyen: el análisis de la estructura detallada del peptidoglicano sintetizado en células tratadas con eter, el estudio de mutantes deficientes en alguna proteína, y la investigación de su papel fisiológico en cepas en fase de crecimiento en medios con ABL que se unan preferentemente a alguna proteína concreta¹⁶⁸. Los datos referentes a la afinidad por diferentes ABL y el peso molecular han permitido diferenciar dos categorías. Las PBPs de alto PM, entre

140.000 y 60.000, sensibles a penicilinas y entre 140.000 y 60.000, sensibles a penicilinas y cefalosporinas y presentes en menor nº en la membrana, son consideradas esenciales en la supervivencia de *E. coli* al estar involucradas en la elongación, septación y aspecto celular. Estas PBPs, 1, 2 y 3, son enzimas importantes fisiológicamente y catalizan las etapas finales de la biosíntesis del peptidoglicano. Su actividad enzimática en *E. coli* ha sido estudiada en profundidad por el grupo de Matsushashi, demostrando que son enzimas bifuncionales que catalizan reacciones de transpeptidación, sensibles a penicilina, y transglicosilación, no sensibles a la misma¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Para el resto de PBPs, de bajo PM y mucho más abundantes en la membrana, se ha determinado su actividad D-alanina carboxipeptidasa sensible a penicilina, pero no se han encontrado por el momento funciones específicas ni fundamentales, considerándose innecesarias para la viabilidad celular¹⁶⁸.

El complejo PBP 1, tiene acción combinada transpeptidasa-transglicosilasa y es una diana letal para la mayor parte de ABL^{173, 174, 180}. Es posible diferenciar dos proteínas de PM similar, PBP 1A y PBP 1B, y a su vez esta última puede resolverse en dos o tres componentes. Los datos más reveladores se han obtenido con la PBP 1B, demostrándose que cataliza la síntesis de peptidoglicano entrecruzado de alto PM a partir de unidades de lípido unidas a disacárido-pentapéptido. Admitida la capacidad bifuncional de la PBP 1B, es probable que la PBP 1A posea actividad similar dado que ambas proteínas muestran gran similitud en su secuencia de aminoácidos. Las PBPs 1A y 1B intervienen en el desencadenamiento de la lisis celular mediante su unión a los ABL, aunque no está completamente dilucidado que componente tiene mayor responsabilidad en la misma. Algunos estudios atribuyen la iniciación del proceso lítico a la PBP 1A, por el contrario otros trabajos se inclinan por una mayor participación de PBP 1B y estiman que la primera no es esencial para el crecimiento bacteriano. Por otra parte, los ABL que bloquean con mayor especificidad la PBP 1B muestran mayor actividad bactericida que aquellos que tienen mayor afinidad por el componente 1A. Además, la función de la PBP 1A sólo parece esencial en ausencia de la PBP 1B¹⁸¹.

La PBP 2, existente en *E. coli* en un nº bajo de copias por célula, 20 aproximadamente, no es una diana letal para muchos

ABL. Sin embargo, parece controlar la fase inicial de la septación y es importante para el mantenimiento del aspecto celular en gram-negativos¹⁷³⁻¹⁷⁴. Los ABL que se unen específicamente a esta proteína - mecilinan, clavams y carbapenems - dan lugar a la formación de células esféricas o redondeadas. También se ha propuesto para la PBP 2 un papel bifuncional transpeptidasa-transglicosilasa aunque sólo en conjunción con el producto del gen vecino rod A¹⁸².

La PBP 3 es una proteína importante en la división celular y en la síntesis de la PC merced a su actividad transpeptidasa-transglicosilasa. A su vez es diana preferencial de penicilinas, cefalosporinas y monobactams, y su inhibición origina la formación de filamentos largos no septados a concentraciones próximas a las CMIs. Este efecto no parece definitivamente letal, toda vez que al eliminar el antibiótico la división celular y el crecimiento bacteriano se reanudan^{173, 174, 180}. En general, las células con morfología bacilar ponen en juego distintos equipos enzimáticos a lo largo de la síntesis de la PC, considerando las fases de división celular o de elongación¹⁷⁴. De la misma forma, las características del peptidoglicano son algo distintas en función de la fase de síntesis que se considere; muy entrecruzado durante la división en la que interviene la PBP 3, que puede utilizar cadenas de pentapeptido como donadores y tripéptidos como aceptores, y menos entrecruzado en la fase de elongación en la que tiene mayor protagonismo la PBP 2.

Por el momento no está bien definido el papel que juegan las proteínas de bajo PM, PBP 4, 5 y 6. No son consideradas esenciales para el crecimiento bacteriano, ni tampoco está dilucidada su participación en el mecanismo de acción de los ABL¹⁸³. De hecho, se ha demostrado la viabilidad celular de mutantes de *E. coli* carentes de estas proteínas¹⁸⁴. Para la PBP 4 se ha demostrado actividad carboxipeptidasa y transpeptidasa, y su participación en el proceso de maduración final de la PC podría tener alguna relevancia, desde el momento que mutantes defectivos en esta proteína muestran una capacidad reducida de entrecruzamiento del peptidoglicano. Las PBPs 5 y 6 tienen actividad carboxipeptidasa y su papel fisiológico en la síntesis de la PC parece irrelevante, como lo demuestra el que bacterias que han sufrido la pérdida completa de ambas proteínas sean perfectamente viables. Por otra parte, mutantes deficientes en PBP 5 y

6 muestran su hipersensibilidad a ABL, corroborando la hipótesis que mantiene que estos enzimas por su afinidad a algunos ABL incrementan las concentraciones necesarias para su inhibición y lisis. En *E. coli* se han caracterizado, en ocasiones, otras proteínas denominadas PBP 7 y 8 cuya función es desconocida.

La afinidad de una o varias PBPs por un ABL, es por tanto, la característica fundamental de cada enzima en su interrelación con el antimicrobiano, hasta el punto que la CMI de un antibiótico para un microorganismo concreto guarda relación próxima con la concentración de antibiótico que satura el conjunto de PBPs. El epígrafe de "esencial" atribuida a algunas PBPs en relación a la PC, a veces no puede ser asignada en toda su extensión cuando concierne a su interferencia con los ABL. Habitualmente, el efecto letal de un ABL es el resultado de la inhibición acumulativa de dos ó más PBPs, y adscribir este efecto a PBPs esenciales en exclusividad, puede ocasionar equívocos.

Por otra parte, el análisis cuantitativo de la afinidad plantea algunos problemas relacionados con las técnicas de estudio, cuando quieren establecerse diferencias entre ABL muy próximos y una misma proteína. Las discrepancias observadas en relación a la afinidad de cefalosporinas similares estructuralmente y PBPs de *E. coli*, son la mejor expresión de cuanto antecede y ratifican la necesidad de interpretar los datos con cautela. La afinidad de una determinada PBP por un ABL es expresada como la concentración de antibiótico requerida para reducir al 50%, y en otros ensayos al 100%, la unión de esa proteína a la penicilina G marcada con C¹⁴. Habitualmente, la afinidad de un ABL por cada PBP es determinada después de la preincubación del antibiótico no marcado radiactivamente, bajo condiciones concretas y preestablecidas de concentración, tiempo y temperatura^{154, 166}. Es comprensible la dificultad de comparar los resultados de estudios no realizados en paralelo.

Un último aspecto a reseñar en cuanto a las características generales de las PBPs se ha suscitado al considerar la verosímil homología o similitud entre PBPs y β las. La posibilidad de conocer las secuencias de aminoácidos de proteínas con residuos serina como lugar activo, permite plantear la hipótesis de un origen evolutivo común¹⁶⁸. Comparando dichas secuencias, la si-

militud parece mayor entre las PBPs de bajo PM y *Blas* con serina como grupo activo. En ambas, dicho grupo está localizado aproximadamente a 40-50 residuos del amino terminal¹⁸⁵. Por el contrario, en las PBPs de alto PM el residuo serina acilado se localiza en la mitad de la secuencia de aminoácidos, y además, poseen una región amino-terminal de 250-450 residuos de la que carecen las anteriores¹⁶⁴. La determinación de la estructura tridimensional de la DD-peptidasa de *Streptomyces* R61 y la de las *Blas* de la clase A de *B. licheniformis* y *B. cereus* ha revelado, asimismo, una marcada identidad en la distribución de los elementos estructurales secundarios, aunque difieran en sus secuencias primarias. Todo ello ha contribuido a considerar a PBPs y *Blas* como miembros de una superfamilia con estructura tridimensional común, favoreciendo la hipótesis del origen evolutivo próximo.

5.4 PBPs DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

El patrón de PBPs y sus funciones descritas para *E. coli*, son de aplicación a la mayoría de las bacterias gram-negativas¹⁸⁶. La mayor similitud se encuentra entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Salmonella* la coincidencia con *E. coli* es manifiesta tanto en cuanto al número y cantidad de PBPs, como al sistema de numeración y funciones^{161, 186}. En *Serratia* se aprecian algunas diferencias no muy sustantivas, y es en el género *Proteus* donde las discrepancias con *E. coli* alcanzan alguna relevancia mayor, aunque la coincidencia entre las diferentes especies es elevada¹⁸⁷. La inferior actividad intrínseca de imipenem y otros carbapenems frente a microorganismos del género *Proteus* pudiera sugerir diferencias más específicas en relación con la PBP 2, diana preferente de estos ABL.

El perfil de PBPs en *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* también es bastante coincidente con el de *E. coli*, aunque el complejo PBP 1 está formado por tres componentes¹⁸⁸, y el PM oscila en un rango de 118.000 y 35.000 D. Las modificaciones morfológicas originadas por la unión de los ABL a las PBPs de estos microorganismos muestran un paralelismo evidente con las producidas en *E. coli*. En otros gram negativos, más distantes en su relación taxonómica, las diferencias son mayores. En *N. go-*

norrhoeae se han caracterizado tres PBPs con PM entre 90.000 y 48.000. La PBP 2 parece esencial, muestra homología con la PBP 3 de *E. coli* y desempeña funciones análogas¹⁶⁸. Un espectro superponible se ha determinado para *B. catarrhalis*¹⁶³. En *H. influenzae* se han descrito ocho PBPs, de las que PBP 2 y 4 se corresponden con 1A y 2 de *E. coli*, mientras que en *B. fragilis* se han caracterizado cuatro PBPs con PM que oscilan entre 100.000 y 32.000, asignandosele a la PBP 2 las funciones esenciales.

5.5 IMPLICACIONES DE LAS PBPs EN LA RESISTENCIA.

La resistencia a ABL por alteraciones en las PBPs, que conlleva modificaciones en la afinidad por los substratos, es un mecanismo bien conocido, demostrado en el laboratorio por Spratt en cepas de *E. coli* y caracterizado en muchas especies bacterianas, tanto de microorganismos gram-positivos como en bacterias gram-negativas^{169, 174, 189-191}. Este tipo de resistencia y la motivada por alteraciones en la ME, se enmarcan dentro del epígrafe "resistencia intrínseca". Si en la segunda, anteriormente descrita, el ABL tiene dificultades para llegar al interior de la célula, en la resistencia mediada por alteraciones en las PBPs, el ABL no es reconocido por su diana y no ejerce su acción. Ambas se diferencian claramente de la resistencia mediada por Eas que contrarrestan la acción del ABL por hidrólisis e inactivación.

En el mundo bacteriano existen numerosos ejemplos de especies que deben su resistencia a un mecanismo en el que están implicadas las PBPs. Ciertamente, este mecanismo de resistencia tiene mayor relevancia en microorganismos gram-positivos. Es bien conocida desde principios de la década de los 60, la resistencia a la meticilina de *S. aureus* y *epidermidis*, hoy preponderante en muchos hospitales. En nuestro país y en otras áreas del mundo, la resistencia a penicilina en *S. viridans* y *S. pneumoniae* es un motivo de seria preocupación. Ambas son debidas a modificaciones en el patrón de PBPs y su afinidad por la penicilina G y otros ABL. La pobre actividad de penicilina G en *Enterococcus* y la, todavía escasa, resistencia a ampicilina, también obedecen a fenómenos en los que las PBPs tienen una responsabilidad casi exclusiva. En gram-negativos la hidrólisis

por *Blas* es preponderante, no obstante, la resistencia mediada por PBPs está bien caracterizada en *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae*, y es más infrecuente o al menos está menos descrita en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*.

Las PBPs son enzimas bacterianas que "funcionan por afinidad" tanto en la síntesis de la PC, como cuando actúan como diana de los ABL. En este sentido, cualquier modificación estructural o funcional debería conllevar la disminución de su afinidad por el sustrato, bien el complejo acil-D-alanil-D-alanina bien los ABL, e implicaría una pérdida de su eficacia como enzimas. Se habla, en general, de alteraciones o modificaciones en las PBPs y de pérdida de afinidad por los sustratos betalactámicos. En teoría, parece un mecanismo simple con variaciones en su expresión fáciles de comprender; en la práctica, no es un mecanismo ni tan posible ni tan frecuente, sin que se produzcan otras alteraciones concomitantes que pongan en peligro hasta la misma viabilidad de la célula bacteriana. En este punto parece congruente preguntarse: ¿qué tipo de alteraciones se producen en las PBPs, como se modifica la afinidad y en definitiva como se produce la resistencia?

Al tener la codificación genética de estas proteínas una base cromosómica, serán precisas mutaciones puntuales en los genes responsables para ocasionar la alteración estructural y funcional. Así, la resistencia a un ABL que tiene diferentes PBPs dianas se alcanzaría, solamente, a través de mutaciones simultáneas en genes distantes entre sí, y este hecho concreto tiene lugar con dificultad e infrecuencia. Se han descrito "vías diversas" que confluyen en la alteración de la afinidad: disminución de la afinidad de alguna de las PBPs que conforman el patrón habitual de cada bacteria; desaparición de alguna de las proteínas esenciales, o por el contrario, aumento considerable en el número de moléculas de alguna de estas proteínas que, obviamente, requerirían una concentración mayor de ABL para su saturación; modificaciones en el perfil de PBPs con sustitución de alguna de las habituales, o síntesis de nuevas PBPs con afinidad selectiva por el sustrato fisiológico y escasa por sustratos betalactámicos. Reconociendo la comodidad de admitir alguna de estos caminos como posibles en la mediación de la resistencia, tal vez en su propia sencillez está implícita la dificultad de estimarlos verosímiles. Spratt, ha resumido recien-

temente los cuatro mecanismos más coherentes, analizando las posibilidades de cada uno¹⁶⁹.

a) Alteraciones en la afinidad de PBPs habituales. Teóricamente es un excelente mecanismo citado de forma genérica en muchos trabajos, pero indudablemente limitado en la práctica por diferentes motivos. En principio, no es muy frecuente que un ABL tenga una sola diana esencial. Más común es que se precise el bloqueo de diferentes PBPs para llevar a término la inhibición de la síntesis de la PC. Por tanto, serían precisas mutaciones secuenciales que afectaran a genes diferentes y modificaciones más o menos extensas en la secuencia de aminoácidos de cada proteína, para que la afinidad se viera comprometida de forma eficaz.

Por un principio de economía vital este mecanismo no es muy factible en la realidad. No debemos olvidar el papel fisiológico de las PBPs en la síntesis de la PC. Tampoco, que alteraciones amplias en la secuencia de aminoácidos, podrían determinar una disminución en la afinidad de las PBPs por su substrato natural - el complejo acil-D-alanil-D-alanina -, que podrían afectar a la propia síntesis de la pared. De esta forma, serían precisas modificaciones que selectivamente afectaran a la afinidad por los ABL, sin alterar el comportamiento de cada PBP en la biosíntesis del peptidoglicano. Tal hipótesis, aunque ideal, dista mucho de la realidad. Indudablemente, este mecanismo sería posible en relación con ABL que inhibieran una sola PBP esencial para el crecimiento. Modificaciones en la secuencia de aminoácidos conllevarían una pérdida de afinidad global, que en el caso del substrato fisiológico sería compensada por la acción de otras PBPs integrantes del patrón habitual.

b) Incremento del número de PBPs. Se trata de modificaciones al alza en el número de moléculas de proteína por célula, lo que implícitamente supondría la necesidad de concentraciones de antibiótico mayores para alcanzar la inhibición del crecimiento. De nuevo se trata de un mecanismo teóricamente verosímil, pero difícil de alcanzar en la práctica, puesto que para incrementar la resistencia a niveles terapéuticamente valorables sería necesario la hiperproducción de diversas PBPs esenciales. Apenas descrito en cepas de origen clínico, considerando la dotación usual de PBPs, si se ha demostrado la hiperproducción de PBP 2'

en cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina.

c) Adquisición ilegítima de una PBP de baja afinidad. Consiste en la incorporación de material genético nuevo para ese microorganismo, capaz de codificar una o más PBPs de escasa o nula afinidad por los substratos betalactámicos. La adquisición es "ilegítima" porque el fragmento de ADN que promueve la síntesis de la nueva PBP no tiene homólogo en la bacteria, de manera que su integración en el cromosoma no precisa de recombinación homóloga.

Ciertamente es un mecanismo ingenioso y rentable, toda vez que la PBP de baja afinidad no es reconocida por el ABL y por tanto no es bloqueada, mientras que es capaz de efectuar la biosíntesis del peptidoglicano supliendo las funciones del grupo usual de PBPs que si son inhibidas. La síntesis de PBP 2' por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, es el ejemplo más evidente de un mecanismo de resistencia eficaz, aunque poco difundido entre las bacterias.

d) Adquisición homóloga de una PBP de baja afinidad. Constituye un buen exponente de la búsqueda y logro del mismo fin por medios distintos. En este caso el fragmento de ADN que va a codificar la síntesis de la PBP de baja afinidad se integra en el genoma bacteriano por recombinación homóloga. Además, este mecanismo, ampliamente demostrado en aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* y *N. gonorrhoeae*, supone el reemplazo de una de las PBPs habituales por otra u otras de baja afinidad. Como en el caso anterior la síntesis de la PC es asumida por estas nuevas PBPs cuando los ABL inhiben la dotacción habitual. Aunque existen mecanismos para limitar la adquisición de secuencias homólogas, la presión selectiva del extenso empleo de los antimicrobianos es un factor que hace propender a la incorporación de material genético por medio de la adquisición homóloga.

Todos estos procesos, propician en mayor o menor grado, la resistencia a ABL por falta de reconocimiento de la diana habitual y conforman el segundo mecanismo de resistencia, en orden de relevancia, en microorganismos responsables de patología infecciosa. Sorprendentemente, la resistencia por alteración en las PBPs es común entre los gram-positivos y tiene mucha menos entidad en microorganismos gram-negativos. Parece como si estos

Últimos estuvieran ya suficientemente protegidos con otros mecanismos de resistencia, esencialmente βlas, como para incorporar más información genética y más actividad biosintética. De hecho, *Neisseria* y *Haemophilus*, escasamente protegidos por la ME y superada terapéuticamente la resistencia por βlas plasmídicas, son los únicos ejemplos de gram-negativos en los que la implicación de PBPs alteradas es partícipe de la resistencia a AβL. Las bacterias gram positivas carecen de ME y la resistencia por impermeabilidad no es posible. Además, la producción de βlas es muy infrecuente en *Streptococcus*, o está superada por AβL resistentes a la hidrólisis enzimática en *Staphylococcus*. De esta forma, la resistencia por modificaciones en las PBPs es el único recurso de que disponen las bacterias gram-positivas para oponerse a la acción de los AβL. No deja de ser reseñable que este modo de resistencia haya proliferado, con mayor asiduidad, en aquellas especies habitualmente tratadas con penicilina G.

5.6 PBPs Y RESISTENCIA EN ENTEROBACTERIACEAE Y P. AERUGINOSA.

En *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* y otros BGNNF la resistencia a AβL es debida, fundamentalmente, a la acción hidrolítica de múltiples βlas plasmídicas o a la hiperproducción de βlas cromosómicas. Además, las alteraciones en la permeabilidad de la ME también pueden jugar cierto papel, de manera más relevante en *Pseudomonas*. Por el contrario, la resistencia motivada por alteraciones en las PBPs no ha sido demostrada de forma convincente en cepas aisladas de muestras clínicas, y las escasas publicaciones encontradas en la literatura hacen referencia, en su mayoría, a trabajos experimentales desarrollados en el laboratorio en cepas de *E. coli*.

En hipótesis, son diversas las razones a las que atribuir la carencia de mutantes con PBPs alteradas. Probablemente, es un mecanismo de resistencia "que no precisan estos microorganismos" suficientemente protegidos por otros más eficaces. Tal vez en el futuro y ante la presión selectiva de AβL con resistencia a un amplio grupo de βlas, puedan adquirir cierta preponderancia formas de resistencia en las que estén más implicadas las PBPs. Por otra parte, la afinidad de varias proteínas por el substrato betalactámico infiere la necesidad de mutaciones múl-

tiples para obtener un nivel de resistencia terapéuticamente valorable. El alcance de estas modificaciones de la afinidad podría afectar al papel fisiológico de las PBPs en la síntesis del peptidoglicano. Todo ello determina la infrecuencia de este tipo de resistencia en **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa**.

La afinidad selectiva de la cefalexina por la PBP 3 ha permitido el desarrollo de cepas de **E. coli**, resistentes por modificaciones en dicha proteína tras la acción de agentes mutágenos¹⁹². El máximo nivel de resistencia alcanzado en un solo paso es, solamente, diez veces superior al inicial. En estas cepas se han detectado tres sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína, y se ha demostrado que el cambio de un solo aminoácido infiere incrementos de la resistencia pequeños, que pasarían inadvertidos en las pruebas de sensibilidad habitualmente realizadas en el laboratorio clínico. La remodelación del sitio activo del enzima por modificaciones más amplias en la secuencia de aminoácidos, con niveles más altos de resistencia, y sin comprometer la estabilidad del enzima parece problemática. No obstante, Hedge y Spratt creen que podrían alcanzarse ambos objetivos si de forma concomitante otras sustituciones consiguieran reestabilizar el enzima¹⁹³.

En **P. aeruginosa** la situación no es muy diferente a la descrita en **Enterobacteriaceae** con relación a la resistencia motivada por PBPs. Mirelman et al. describen resistencia a ABL en un aislamiento de origen clínico, como resultante de un efecto combinado de alteraciones en la permeabilidad y disminución en la afinidad de PBPs¹⁹⁴. En otro estudio desarrollado con cepas resistentes, seleccionadas durante el tratamiento con piperacilina y tobramicina en un paciente con fibrosis quística, Godfrey et al. demuestran diversas modificaciones en el patrón de PBPs y su afinidad¹⁹⁵. En cepas del serotipo K con bajo nivel de resistencia, la PBP 3, diana preferente de la piperacilina, está ausente o muestra muy bajo perfil de afinidad por el antibiótico. En una cepa del serotipo M, con un nivel de resistencia intermedio, se detecta afinidad disminuida por el patrón de PBPs esenciales y una cantidad considerable de PBP 6. A juicio de los autores, estas modificaciones se correlacionan adecuadamente con los niveles de resistencia.

En conclusión, las repercusiones que en la sensibilidad a los

ABL tienen las alteraciones en las PBPs son mayores en los microorganismos gram-positivos. En ellos, el fenotipo de afinidad se traduce bien en el de sensibilidad, con valores de CMI próximos a las concentraciones requeridas para inhibir las PBPs. En gram-negativos "es otra historia", y hasta es posible que las supuestas modificaciones en la afinidad no sean fácilmente detectables por los tests "in vitro", enmascaradas por valores de inhibición más concordantes con mecanismos más eficaces y mucho mejor conocidos.

6. BETALACTAMASAS Y RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

6.1 INTRODUCCION Y PERSPECTIVA HISTORICA.

Las betalactamasas (β las), en estricto sentido conceptual, son enzimas cuyo sustrato son los antibióticos betalactámicos (ABL) naturales, semisintéticos ó de síntesis total, desarrollados desde la bencilpenicilina hasta hoy. No obstante, esta sencilla definición encierra la historia del mecanismo bacteriano de resistencia que más ha contribuido al progreso de la antibioterapia. Ciertamente, en estos 60 años han ocurrido múltiples acontecimientos, en íntima dependencia unos de otros, siempre con el sustrato común de la interrelación β las-ABL.

Las primeras referencias de esta "historia interminable", están muy próximas en el tiempo al descubrimiento de la penicilina G. En 1929, Fleming pone de relieve que el crecimiento de alguna bacteria del grupo "coli-tifoidea" no es inhibido por la penicilina¹. Años después, en 1940, y con anterioridad a su introducción como antimicrobiano de uso habitual en la práctica clínica, Abraham y Chain demuestran que el extracto de un cultivo de *E. coli* inactiva la penicilina y adelantan la hipótesis de un mecanismo de hidrólisis enzimática denominando al enzima penicilinasas⁶⁷. El trabajo tiene gran relevancia y su fecha de publicación fué considerada en 1979 por Hamilton-Miller, en su "An Historical Introduction to β -Lactamase", con el epígrafe "Penicillinase was born a December 28th 1940"¹⁹⁶. Algo más tarde, Kirby en 1944, demuestra que la producción de penicilinasas se correlaciona bien con la resistencia de *S. aureus* a penicilina, de forma que este fenotipo de resistencia pasa muy pronto a ser dominante tanto en el medio hospitalario como en la comunidad⁸.

El término "penicilinasas" aparece por vez primera en el volumen 36 de Quaterly Cumulated Index Medicus publicado en 1944, totalizando 91 trabajos hasta 1956. Posteriormente, y ya en el actual Cumulative Index Medicus se citan 22 estudios en 1960, año de su aparición. Desde entonces la bibliografía sobre β las ha desbordado cualquier previsión y hoy constituye uno de los capítulos más profusos de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Las sucesivas revisiones de la Enzyme Commission y la nomenclatura oficial asignada a las β las no han sido muy afortunadas, e incluso han motivado alguna confusión. Inicialmente, en 1965, fueron incluidas como "Penicillin Amido β -Lactam Hydrolases" EC 3.5.2.6. La denominación "cefalosporinasas" no aparece hasta la revisión de 1972 con las siglas EC 3.4.2.8 como si se tratara de un enzima completamente diferenciado. La distinción entre β -lactamasas I - penicilinasas - y β -lactamasas II - cefalosporinasas - lejos de ser esclarecedora introdujo más elementos de confusión. Actualmente, ambos conceptos están incluidos en el término genérico β -lactamasas nominado con la abreviatura EC 3.5.2.6¹⁹⁶.

La década de los años 60 fué definitiva en la consolidación de las β las como mecanismo de resistencia de gran repercusión. En 1963, Novick demostró que el gen que codificaba la producción de penicilinasas en *S. aureus* era plasmídico¹⁹⁷. Poco después, 1965, Datta y Kontomichalou documentan fehacientemente que en *Enterobacteriaceae* la síntesis de penicilinasas también es codificada por plásmidos¹⁹⁸. En paralelo a estos hallazgos y siempre en interdependencia la llegada de las penicilinas semisintéticas, ampicilina y carbenicilina, a los formularios hospitalarios tiene una enorme trascendencia no sólo porque inicia para los ABL las vías terapéuticas frente a gram-negativos, sino porque motiva el estudio en profundidad de los mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana a ABL. A partir de este momento, la síntesis plasmídica de β las y la interrelación β las-ABL adquieren nuevas y múltiples dimensiones, que configuran un fenómeno muy dinámico en constante evolución.

La década de los años 70 afianza a las β las plasmídicas como un dispositivo de resistencia de primera magnitud. Durante su discurrir tienen lugar la "explosión numérica" de estas enzimas y su difusión a la mayoría de las bacterias gram-negativas. Tres hechos parecen más sobresalientes: el hallazgo de Hedges y Ja-

cob en 1974 de los elementos de transposición como vehículos de codificación y diseminación de la resistencia¹⁹⁹; la posibilidad, ofrecida por Matthew et al. en 1975, de diferenciar bién dos β las por medio del isoelectroenfoque analítico (IEE)²⁰⁰; y la caracterización, por Sutcliffe en 1978, de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de TEM-1²⁰¹. Desde 1951, Abraham, había especulado con la variabilidad enzimática. Smith y Hamilton-Miller, en 1963, adelantan una hipótesis según la cual cada especie bacteriana, al menos en gram-negativos, produce una β la diferente¹⁹⁶. Matthew y Harris en 1976, confirman esta última presunción y afirman la especificidad de las β las a nivel de especie y sub-especie²⁰². La caracterización de las β las plasmídicas de los tipos OXA y PSE²⁰³, la diseminación de TEM-1 a otros microorganismos como Haemophilus y Neisseria²⁰⁴, y la constatación de este mecanismo en Streptococcus²⁰⁵, ratifican las premoniciones anteriores y dejan el camino expedito a otras alternativas futuras de resistencia.

En los años 80 tienen lugar, en relación con el universo de las β las, dos acontecimientos que expanden los caminos de la resistencia. Por una parte, la configuración de las β las cromosómicas inducibles y su derrepresión, como un mecanismo eficaz que determina resistencia clínica a los A β L y fracaso terapéutico-²⁰⁶. En otro sentido, "el estallido" a expensas de TEM-1 y 2 y SHV-1 de más de 40 nuevas β las plasmídicas de espectro muy ampliado, que confieren resistencia a los nuevos A β L y limitan de forma significativa las opciones terapéuticas²⁰⁷. Por el momento, estos son los últimos capítulos de esta "historia interminable". Con seguridad, en breve, se hará preciso abrir nuevas páginas.

Es conveniente, por tanto, aproximarse al "universo de las β las" por caminos diferentes. En su acepción más estricta, se trata de enzimas que hidrolizan el enlace amida cíclico del anillo betalactámico, dando lugar a productos exentos de cualquier actividad antimicrobiana. La inactivación, por hidrólisis de los A β L, parece el objetivo más explícito y desde luego el mejor conocido de estas hidrolasas. No obstante, la elevada probabilidad de que una β la regida por el cromosoma esté presente en todas las bacterias²⁰²; la síntesis enzimática por cepas nunca tratadas con A β L²⁰⁸; el mantenimiento de estas enzimas en la diferenciación evolutiva de las bacterias; y el fra-

caso en el desarrollo de organismos viables carentes de enzima, sugieren que las β las pueden desempeñar un papel, por concretar, en la fisiología bacteriana²⁰⁹. Se ha sugerido relación entre β las y metabolismo bacteriano, propiciada por su localización periplásmica y su facilidad para ser inducidas por un componente del peptidoglicano²¹⁰. Tal vez, la función fisiológica habitual de las β las esté más cercana a la rotura de alguna estructura betalactámica considerada transitoria o intermedia en la síntesis de la pared celular²⁰⁹.

Desde una perspectiva diferente se pueden considerar las β las como el determinante mayor, aunque no único, de la resistencia a ABL en gram-negativos y la causa inmediata del desarrollo inusitado de los ABL. Entre la población bacteriana de origen clínico se han caracterizado más de 100 β las diferentes, codificadas por el cromosoma o por plásmidos y transposones, que constituyen un arsenal genético de resistencia de primera magnitud. La identificación progresiva de nuevas β las no sólo debe responder a una mejora evidente en las técnicas de estudio, sino también a la respuesta del universo microbiano al desarrollo de nuevos ABL cada vez más eficaces y resistentes a enzimas previos. La resultante de esta dinámica es que no exista un solo ABL que no sea hidrolizado por alguna β la. No es aventurado afirmar, por tanto, que las β las constituyen el mecanismo de resistencia de mayor responsabilidad en la terapia antimicrobiana.

Son muy variados los aspectos interesantes que el mundo de las β las ofrece al investigador básico, al microbiólogo clínico y también al médico interesado en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Con independencia de lo que conceptualmente se entiende por β las y de las distintas perspectivas de aproximación, la profundización en el mundo de estas enzimas requiere conocer: a) como es posible presuponer su existencia en una cepa aislada en el laboratorio de microbiología; b) como identificarlas, caracterizarlas y en definitiva diferenciarlas unas de otras; c) cuantas existen y como es posible clasificarlas; d) cual es su distribución entre los microorganismos de procedencia clínica, y finalmente; e) en que medida participan en la resistencia a ABL y cual es su repercusión en el tratamiento.

6.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BETALACTAMASAS.

La actividad hidrolítica es la constante más característica de las β las y su primordial propiedad. No obstante, el enfoque más adecuado de las β las tiene dos vertientes: una como enzima y otra como proteína. La resultante de este examen dual, sumaria las características generales de las β las.

La hidrólisis por β las del enlace betalactámico determina la formación final de productos biológicamente inactivos²¹¹. En el caso de las penicilinas se produce ácido peniciloico en proporciones estequiométricas, provisto de dos grupos ácidos que le confieren estabilidad y permiten su detección por distintas técnicas. En el caso de las cefalosporinas, las circunstancias son más complejas y difieren según el grupo químico dispuesto en C₃. El teórico ácido cefalosporoico, formado tras la hidrólisis enzimática, es muy inestable y se descompone con rapidez, dando lugar a sustancias distintas en función de los radicales presentes en C₃. Esta inestabilidad conlleva arduas dificultades en la detección y cuantificación de los productos finales de la reacción.

Por varias razones, y fundamentalmente por su significación en la resistencia a A β L, conviene distinguir las β las de otras enzimas bacterianas, penicilin-acilasas o amidasas y esterases, que actuando a otros niveles en la molécula de A β L consiguen la hidrólisis de estructuras colindantes al núcleo betalactámico y originan productos que mantienen cierta actividad antimicrobiana²¹¹. Las amidasas o acilasas hidrolizan la cadena lateral acil en C₆ de penicilinas y C₇ de cefalosporinas, originando sustancias con actividad biológica algo inferior a la del A β L original. Las esterases solo actúan sobre cefalosporinas, obteniendo por hidrólisis la separación del grupo acetil contenido en el radical acetoximetil sustituyente en C₃ de alguno de estos compuestos. Cefalotina y cefotaxima son dos buenos ejemplos de esta degradación enzimática que siempre conlleva pérdida de la actividad antibacteriana, aunque la sustancia desacetilada muestre sinergia, en algunos casos, con el A β L del que procede. Algunos autores incluyen en este apartado las dehidropeptidasas renales de mamíferos, activas frente a A β L del tipo carbapenems.

En tanto en cuanto una β la es un enzima, el desarrollo de la reacción catalizada es prioritario y puede expresarse de acuerdo con la formulación siguiente:²¹²



Inicialmente, la enzima se une al substrato originando un complejo no covalente sin actividad antimicrobiana. En ese estado, enzima y substrato pueden disociarse, o continuar la reacción para formar un complejo covalente acil-enzima a través de un grupo activo serina. La deacilación de este complejo, que también es biológicamente inactivo, con hidrólisis del substrato como producto final y la liberación del enzima activo, completan el proceso.

El desarrollo pormenorizado de la reacción no es igual para todas las β las, o expresado de otra manera, no todas las β las hidrolizan a los diferentes ABL con la misma eficacia. TEM-2, una β la con un promotor eficaz, se muestra altamente eficaz frente a bencil-penicilina, hidrolizando 2.000 moléculas por segundo por cada molécula de enzima. En sentido opuesto, esta β la es ineficaz frente a la cefoxitina y las cefalosporinas de 3ª generación, de las que hidroliza 0,1 moléculas por segundo por cada molécula de enzima. El denominado "turnover number", representado por K_{cat} o por la constante K_3 de la reacción antes citada, expresa numéricamente la mayor o menor eficacia hidrolítica²¹².

Cualquier reacción catalizada por un enzima viene caracterizada por dos parámetros cinéticos, V_{max} y K_m , diferentes para cada combinación enzima-substrato y determinados mediante diagramas estandarizados²¹³. V_{max} representa la máxima velocidad de hidrólisis de la reacción, mientras que K_m , constante de equilibrio de Michaelis, significa la afinidad del enzima por el substrato y es equivalente a la concentración de ABL hidrolizada a 0.5 de V_{max} . Las distintas expresiones matemáticas que se pueden establecer en función de los valores V_{max} y K_m , permiten representar la actividad hidrolítica de una β la con propósitos comparativos. La tasa de hidrólisis de un antimicrobiano por una β la puede venir expresada por el valor V o velocidad de hi-

drólisis (1), aunque parece más representativo hacerlo por medio de la "eficiencia hidrolítica" o "eficiencia fisiológica", simbolizada por el cociente (2). Esta relación es más útil con fines comparativos entre diversas β las y un determinado sustrato betalactámico. Tiene en cuenta afinidad e hidrólisis, especialmente cuando se trabaja con concentraciones de ABL menores que K_m , situación habitual o más frecuente en el espacio periplásmico de las bacterias gram-negativas^{142,214,215}.

$$V = \frac{V_{\max}(s)}{K_m + (s)} \quad (1) \quad \text{Eficiencia hidrolítica} = \frac{V_{\max}}{K_m} \quad (2)$$

La determinación de la actividad β la debe realizarse frente a un amplio rango de concentraciones de ABL que remeden las más usuales en el espacio periplásmico. A este respecto, parece más propicia la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos, en relación con los que utilizan técnicas yodométricas o acidimétricas²¹⁴. Con todo, tiene varias limitaciones en relación con los cambios de absorbancia a concentraciones próximas a la K_m , que implican la necesidad de lecturas, al menos, por duplicado. Además, es preciso tener en cuenta que una tasa de hidrólisis lenta puede imposibilitar la determinación correcta de V_{\max} y K_m . Todo ello implica obtener datos comparativos dentro de un mismo laboratorio, expresar los resultados dentro de un límite y nunca con valores de 0, y en definitiva ser cauteloso en el análisis de los resultados.

La reacción catalizada por una β la no siempre determina la hidrólisis del sustrato, ya que en función de las características del mismo puede seguirse de la inhibición enzimática²¹². El desarrollo de la reacción es superponible al de la hidrolítica formulada anteriormente, sin más que sustituir el sustrato (S) por el inhibidor (I) y la interacción está caracterizada por una constante de equilibrio K_i que equivale a k_{-1}/k_1 . En función del inhibidor, puede ser más conveniente expresar la actividad inhibitoria en términos de I_{50} o concentración que proporciona el 50% de inhibición bajo una serie de condiciones de ensayo prefijadas. Existen diversos tipos de inhibidores de β las divididos en: no betalactámicos - EDTA, O-fenantrolinea, pCMB, a. borónicos -; ABL - cloxacilina, cefoxitina, cefalosporinas de 3ª generación, aztreonam, imipenem, meropenem -; y be-

talactámicos con escasa actividad antimicrobiana "per se" - a. clavulánico, sulbactam, tazobactam, BRL 42715B -. Las posibilidades de inhibición de una β la por diferentes inhibidores varían entre las enzimas haciendo posible su diferenciación. En general, y con los betalactámicos de forma obligada, los ensayos de inhibición deben efectuarse con y sin incubación previa del enzima con el inhibidor, efectuando una determinación de la tasa constante de inhibición²¹².

La estimación de una β la como enzima no finaliza con su actividad hidrolítica. También, y de nuevo en cuanto que es un enzima, una β la puede considerarse como la expresión de un gen, localizada una vez sintetizada, en el espacio periplásmico y producida en cantidades variables y susceptibles de modificación por inducción o mutación. Estas características permiten distinguir entre β las codificadas por el cromosoma, y β las regidas por elementos extracromosómicos, plásmidos y elementos de transposición, conformando dos grupos bien diferenciados con propiedades y fisiología dispares, que facilitan, al menos en gram-negativos, su clasificación.

Además, el nivel de expresión tras su síntesis puede modificarse por inducción específica con substratos betalactámicos, o por fenómenos de mutación en la maquinaria genética responsable. Esta nueva diferenciación permite discriminar entre β las constitutivas no susceptibles de inducción, cuyo nivel de producción es constante, y β las inducibles cuya producción se aumenta transitoriamente como consecuencia de la inducción, disminuyendo su nivel a un "status" basal cuando cesa la acción del agente inductor. Hoy por hoy, todas las β las plasmídicas parecen constitutivas dependiendo su nivel de producción de la regulación genética del plásmido o transposón, y en ningún caso susceptibles a fenómenos inductivos. Por el contrario, entre las β las cromosómicas existen ambas modalidades fisiológicas, aunque desde el punto de vista clínico tienen mayor relevancia las enzimas inducibles, frecuentes en algunas **Enterobacteriaceae** y **Pseudomonas**, y responsables de no pocos fracasos terapéuticos.

La posibilidad de ser excretada al exterior divide, un poco artificialmente, a las β las en intra y extracelulares. La conformación de las estructuras externas de los gram-positivos con-

siente la salida de enzimas al exterior celular y en este sentido tildamos a las β las de gram-positivos de extracelulares. Esta propiedad está abolida para los gram-negativos, salvo escasísimas situaciones de excepción, y por ello hablamos de enzimas intracelulares y periplásmicas.

Las propiedades físicas de las β las como proteínas son también parámetros habituales para la diferenciación entre enzimas. Algunas como el peso molecular (PM) y la movilidad electroforética son consideradas, actualmente, obsoletas o de aplicación marginal. El punto isoeléctrico (pI), en primera línea de la caracterización durante 10 años, ha perdido singularidad ante la aparición de nuevas β las plasmídicas con valores de pI coincidentes. No obstante, es un parámetro muy útil en combinación con estudios genéticos relativos a las secuencias de nucleótidos del gen codificador o a la secuencia de aminoácidos de la proteína relacionada.

Nuestra comprensión de las β las se ha ampliado notablemente al conocerse la estructura molecular y la secuencia de aminoácidos de alguna de estas proteínas y su posible semejanza evolutiva y funcional con las PBPs²¹⁶. Los trabajos de Ambler²¹⁷ en 1980, Jaurin y Grundstrom²¹⁸ en 1981, y Bergstrom et al.²¹⁹ en 1982, han perfilado la diferenciación de tres clases moleculares con estructura y PM distintos, aunque una gran parte de las β las está todavía por secuenciar y clasificar a nivel molecular. En la clase A, caracterizada por la presencia de un grupo serina como sitio activo, se incluyen las β las plasmídicas más comunes: TEM-1 en gram-negativos y PC1 de *S. aureus*. La clase B acoge un grupo de β las con características de metaloenzimas cuyo representante más genuino es la cefalosporinasa de *B. cereus*. Sus integrantes son poco frecuentes entre las cepas clínicas, aunque la resistencia enzimática a carbapenems en *X. maltophilia* y la recientemente descrita en *P. aeruginosa* son debidas a enzimas de esta clase. La clase C está exclusivamente formada por β las cromosómicas de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, también con serina como lugar activo. La cefalosporinasa AmpC de *E. coli* es la enzima tenido por prototipo. Muestra amplia homología secuencial con la β la de *Shigella* y en menor grado con las de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia* y *P. aeruginosa*. Recientemente, Huovinen et al.²²⁰ han propuesto una nueva clase D para distinguir las oxacilinasas y alguna de las carbeni-

cilinasas, cuya secuencia de aminoácidos difiere sensiblemente de otras β las plasmídicas de la clase A²²⁰.

La similitud estructural y funcional entre PBPs y β las ya ha sido citada en el capítulo previo referente a PBPs. Mucho se ha especulado sobre el origen común de β las y PBPs, en base a la homología entre β las de la clase A y L-alanina carboxipeptidasa de *B. cereus*^{221,222}. Esta hipótesis inicial se ha reforzado considerando que la estructura terciaria o configuración tridimensional de la β la de *B. licheniformis*, guarda similitud manifiesta con la PBP de *Streptomyces* R6²²³. Además, ambas proteínas exhiben semejanza a nivel funcional estimando su genética y fisiología. La posibilidad de incrementar el nivel de producción por inducción no es algo que afecte solo a las β las, sino también a la PBP 2', responsable de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus*²²⁴. En este género la regulación de los genes que codifican ambas proteínas se efectúa por mecanismos relacionados²²⁵.

Algunas PBPs tienen debil actividad β la hidrolizando, con tasas bajas, distintos ABL²²⁶, si bién la actividad fisiológica de las β las está todavía a nivel de mera hipótesis. Lo que sí está comprobado es que mutaciones que determinan modificaciones en la afinidad por las cefalosporinas, afectan a genes que gobiernan la síntesis tanto de PBPs como de β las, y que los genes que codifican PBPs pueden ser plasmídicos, al igual que los genes β la, confiriendo resistencia a ABL cuando se transfieren a una célula huésped donde se replican originando un elevado número de copias¹⁹³. Finalmente, la enorme ubicuidad de β las y PBPs en bacterias sensibles y resistentes a ABL, sustenta la hipótesis de una estrecha correlación entre ambos tipos de proteínas.

6.3 DETECCION Y ENSAYO DE BETALACTAMASAS.

Conforman el conjunto de técnicas que permiten identificar y cuantificar la presencia de una o varias β las en un microorganismo. Inicialmente, el patrón de sensibilidad-resistencia a ABL, conocido como fenotipo, es una traza suficientemente indicativa de la codificación enzimática. La expresión de la resistencia a través de los datos de sensibilidad, bién diámetros de halo de inhibición, bién valores de CMI, son un reflejo bastan-

te fidedigno del patrón hidrolítico del enzima, y aunque la hidrólisis enzimática no determina siempre resistencia clínica, los parámetros obtenidos en los estudios de sensibilidad permiten una presunción bastante fundada de la β la implicada. Estas pruebas son, por tanto, un paso inicial en la diferenciación de β las.

La detección de β las tiene dos vertientes según que solamente ponga de manifiesto la presencia enzimática, aspecto cualitativo, o avance en la estimación de la cantidad de enzima producida por la bacteria, aspecto cuantitativo. Ambos aspectos comparten tecnología similar en cuanto a sus fundamentos, diferenciando en su realización práctica.

El análisis cualitativo de β las se efectúa por distintos métodos, químicos o microbiológicos, basados siempre en los cambios que tienen lugar como consecuencia de la hidrólisis del ABL. La formación de un compuesto ácido a expensas de un carboxilo adicional, puede detectarse por su capacidad para reducir el yodo o mediante el empleo de indicadores de pH, dando lugar a métodos yodométricos o acidimétricos²¹⁴. Los primeros no gozan de mucha sensibilidad, mientras que los segundos no permiten la distinción entre actividad β la y acilasa. Actualmente, ambas técnicas han caído en desuso en favor de la detección con nitrocefin o cefalosporina cromogénica, que aprovecha el salto electrónico que tiene lugar en la molécula para, mediante el cambio de color originado, detectar la presencia del enzima²²⁷. Es un método muy sensible que puede ponerse en práctica con discos de papel o barritas impregnadas con la sustancia, o de manera más concluyente utilizando la técnica del "spot test". Se puede trabajar directamente con una suspensión del microorganismo supuestamente productor de β la, o mejor con extractos enzimáticos obtenidos después de la sonicación de un cultivo en fase logarítmica. En **Staphylococcus** ambas técnicas proporcionan buenos resultados, si bien en cepas debilmente productoras del enzima es conveniente recurrir a la inducción previa. En gram-negativos, la localización periplásmica de la β la invalida el empleo de discos o barritas excepto en **Haemophilus** y **Neisseria**, mientras que para el resto es conveniente trabajar con extractos que no precisan purificación.

Además de estos métodos químicos, se han usado con éxito dife-

rente dos técnicas microbiológicas basadas en la inactivación del ABL revelada por la técnica de difusión por disco. En la primera de ellas, test descrito por Masuda en 1976²²⁸, se observa la destrucción del ABL por medio de discos cargados con extractos bacterianos que contienen el enzima y su influencia en la sensibilidad de un microorganismo testigo, generalmente - **Micrococcus luteus**. El segundo es el test denominado "hoja de trébol" descrito por McGhie un año después²²⁹, que mantiene idéntico fundamento aunque en vez de emplear extracto utiliza un cultivo en fase logarítmica del microorganismo cuya producción de β la se quiere detectar. Esta técnica se ha empleado de manera más asidua en **Haemophilus** y **Neisseria**.

El ensayo cuantitativo de la cantidad de β la producida por una bacteria requiere la obtención de extractos bacterianos por sonicación. Las técnicas de estudio se agrupan en dos apartados según que se efectúe el análisis de los productos de la hidrólisis enzimática: métodos yodométrico²³⁰, acidimétrico²³¹ o espectrofotométrico de Samuni²¹⁴, ó bien se determine la concentración de sustrato que queda sin hidrolizar: métodos microbiológico²³², de la hidroxilamina²³³ o espectrofotométrico de O'Callaghan²³⁴. Este último descrito en 1968, se ha hecho muy popular y con distintas variantes que afectan al programa o al sustrato, es el más utilizado. La hidrólisis del anillo betalactámico supone disminución de la densidad óptica de la solución a la longitud de onda de máxima absorción. Esta disminución puede ser detectada por el espectrofotómetro en términos de sustrato no hidrolizado y transformada en unidades de β la o concentración de ABL, generalmente en micromoles hidrolizados por unidad de tiempo, minutos ó segundos, y por milígramo de proteína en el extracto enzimático. Se han empleado múltiples sustratos betalactámicos aunque los más comunes son la cefaloridina, por sus amplias posibilidades de ser hidrolizada por casi todas las β las, y el nitrocefin.

6.4 CARACTERIZACION DE BETALACTAMASAS.

La caracterización de β las persigue la individualización enzimática. Esta tarea de poner "nombre y apellido" a cada enzima, diferenciar a las de familias distintas y distantes, y distinguir también entre las muy próximas, además de atractiva ha su-

puesto un reto de progreso tecnológico. En efecto, en la medida en que se ha ampliado la oferta de ABL, las bacterias han ido evolucionando y perfeccionando sus dispositivos enzimáticos de supervivencia. Las nuevas Blas encontradas sucesivamente son fruto de esta dinámica, pero también del esfuerzo tecnológico que ha hecho posible la distinción entre enzimas con propiedades enormemente cercanas. Una Bla solamente puede ser caracterizada a través de la información combinada sobre parámetros diferentes. Algunos de ellos no han soportado el paso del tiempo y hoy se consideran obsoletos; otros han mantenido su utilidad y están vigentes aunque precisan de información adicional. La mayoría no pueden individualizarse como parámetros patognomónicos de un enzima y sólo es de su yuxtaposición cuando surge la diferenciación.

El peso molecular (PM), un parámetro utilizado inicialmente con asiduidad, es hoy una dato poco relevante por su escasa sensibilidad. Historicamente, la determinación del PM se ha realizado mediante técnicas de cromatografía de exclusión en gel o filtración en gel, que tienden a subestimar los valores reales²⁰⁹. Después, se han utilizado ampliamente métodos de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico, que han aproximado cifras reales obtenidas del análisis de aminoácidos y cifras experimentales²³⁵. De cualquier manera es un parámetro de valor relativo en la diferenciación entre Blas.

La comunicación por Matthew et al. en 1975, de que dos Blas podían diferenciarse con nitidez por su punto isoeléctrico (pI) fué una noticia científica de primer orden y contribuyó decisivamente a avanzar con rapidez en la identificación de nuevas Blas, así como en su clasificación^{200,202}. En definitiva, la determinación del pI por isoelectroenfoque (IEE) no es más que un método de separación de proteínas en el cual las Blas se alinean como bandas diferenciadas en su pI, en un gradiente de pH producido electroforéticamente en geles de poliacrilamida. También se han utilizado geles de agarosa muy purificada que acortan el tiempo de enfoque²³⁶. El patrón específico de cada Bla consta de una banda principal y varias bandas adicionales que una vez separadas se revelan mediante la aplicación de una solución de nitrocefina, sólo, o en combinación con algún inhibidor, esencialmente cefoxitina y ceftriaxona²³⁷. Con esta técnica se alcanza un alto grado de resolución, toda vez que el

enfoque en el gel es causado por fuerzas que actúan contra la difusión, de manera que las β las son concentradas durante su separación.

El IEE es un método sencillo y de excelente rendimiento, cuya duración se ha acortado notablemente mediante dispositivos comercializados - PHAST GEL - que utilizan elevados voltajes y no requieren refrigeración. Además, el extracto bacteriano conseguido por sonicación no necesita, en principio, un alto grado de purificación previa, aunque es conveniente conocer con antelación la actividad β la del mismo. La obtención de conclusiones firmes respecto al pI, precisa la utilización en paralelo de β las prototipos de pI bien conocido que permitan extrapolar con objetividad los datos leídos en el gel. A este fin, es conveniente la comparación de los hallazgos entre laboratorios que sigan técnicas idénticas y extractos de prototipos similares. El IEE permite distinguir bien entre β las muy próximas; desafortunadamente, la reciente aparición en número inusitado de nuevas β las plasmídicas de pI coincidente ha quitado protagonismo a esta técnica que ahora, y en algunos casos, debe complementarse con otras más avanzadas que facilitan la individualización.

El perfil de substrato (PS) hace referencia al rango de A β L hidrolizados por cada β la, resumiendo la actividad hidrolítica de un enzima concreto sobre un número determinado de substratos betalactámicos. Algunos expertos consideran al PS como la piedra angular en la interrelación β las-A β L. Existen diferentes formas de expresar parámetros relacionados con el PS. Idealmente, deberían obtenerse para cada binomio β la-A β L datos referentes a V_{max} y K_m . En la práctica cotidiana, los datos más frecuentes en cuanto a PS vienen expresados como tasa de hidrólisis, o tasa relativa de hidrólisis, obtenidos a una sola concentración de substrato pero en relación con un número extenso de A β L⁴⁵. Adscribiendo a 100 la tasa de hidrólisis de la penicilina G, ampicilina o cefaloridina, se expresan el resto de los valores hidrolíticos referidos a ese valor, de manera que un análisis comparativo permita catalogar como penicilinasas, cefalosporinasas o β la de amplio espectro al enzima en cuestión. El "estado del arte" se ha ido complicando progresivamente con la aparición de substratos nuevos y nuevas β las, de forma que hoy es obligatorio ampliar el elenco de A β L ensayados a cefa-

losporinas de 3ª generación, monobactams y carbapenems.

La determinación en el laboratorio de la tasa relativa de hidrólisis no es excesivamente complicada, aunque precisa de ciertos requisitos que la validen a efectos comparativos. El extracto enzimático debe contener una sola β la, dato obtenido por IEE previo, y debe poseer un alto grado de pureza y concentración, alcanzadas por técnicas de fraccionamiento y concentración en columnas cromatográficas. La concentración de ABL y β la utilizadas en los ensayos tienen una importancia trascendental en el momento de obtener conclusiones. Una proporción que remede lo más fidedignamente posible la fisiológica en el espacio periplásmico, adecúa los hallazgos a la realidad hidrolítica aproximandola a los resultados obtenidos en los tests de sensibilidad "in vitro", e incluso a los resultados clínicos. Muchas β las muestran inhibición del substrato a elevadas concentraciones por encima de 1mM, en consecuencia las determinaciones que emplean esta o superiores concentraciones adolecen de fiabilidad. En esta situación están los datos reflejados en la literatura de los años setenta, cuando eran usuales concentraciones de 5-6 mM²³⁵. Estudios más recientes recomiendan concentraciones bajas de 100 ug/ml, o bien 200 uM o incluso 100 uM²¹². Por otra parte, el empleo de concentraciones fijas e iguales de substrato para todos los ABL implica conclusiones erróneas a menos que todos los ABL tengan Km similar. De cualquier forma, es imperativa la obtención de datos por triplicado y con distintas concentraciones para asegurar el papel hidrolítico de una β la frente a diferentes ABL.

El perfil de inhibición (PI) de una β la, o grupo de compuestos betalactámicos y no betalactámicos que inhiben la actividad hidrolítica, es tan importante como el PS en la caracterización enzimática²³⁵. De hecho, todas las clasificaciones de β las a partir de la propiciada por Jack y Richmond en 1970, incluyen los datos de inhibición para identificar las enzimas, y la última clasificación, por el momento, de Bush, concede a la inhibición por a. clavulánico un carácter preponderante. En este sentido, a. clavulánico, sulbactam y tazobactam son el mejor ejemplo de los inhibidores betalactámicos con escasa actividad antibacteriana "per se", a los que se ha añadido recientemente el compuesto BRL 42715B de mayor espectro inhibitorio y eficacia, al menos "in vitro", frente a β las cromosómicas inducibles y constitutivas.

La cloxacilina fué el primer ABL utilizado en la caracterización, a la que se han sumado cefoxitina, cefalosporinas de 3ª generación, aztreonam e imipenem en algún caso. Cuando es posible y sobre todo para substratos pobres, la expresión de la actividad inhibidora se hace a través de la K_i , no obstante parece inapropiado hacerlo para algunos inhibidores, a. clavulánico o sulbactam, por su complejo modo de acción y porque no expresa bien la interacción entre enzima e inhibidor²³⁸. En estos casos y en algún otro, parece más oportuno recurrir a la I_{50} como índice de afinidad, que supone la concentración de inhibidor requerida para inhibir al 50% la actividad enzimática, bajo condiciones de ensayo bien definidas en cuanto a sustrato y tiempo de preincubación. También se han usado otros compuestos no betalactámicos, ClNa, pCMB y EDTA, en la caracterización de Blas. El empleo del primero tiene ya matices exclusivamente históricos. La actividad inhibitoria del pCMB, expresada habitualmente en términos de sensible (+) o resistente (-), indica la presencia de residuos cisteína catalíticamente importantes. La inhibición por EDTA suele implicar la necesidad de un metal para que el enzima sea operativo.

Recientemente, Papanicolaou y Medeiros han descrito un método basado en la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín, muy útil en la discriminación entre Blas²³⁹. La tasa de inhibición de la hidrólisis enzimática del nitrocefín es medida en un fotómetro mediante el cambio en la absorción (A_{480}) durante 45 minutos y frente a múltiples inhibidores betalactámicos. Utilizando un grupo de Blas bien caracterizadas, estos autores confirman la eficacia del método en la diferenciación de Blas al correlacionar bien el patrón de inhibición obtenido con el pI y con la secuencia de aminoácidos, lo que en su opinión sugiere que el perfil de inhibición refleja alteraciones en la configuración del sitio activo del enzima. El método parece especialmente conveniente en la determinación de la afinidad relativa de Blas frente a substratos pobremente hidrolizados y en los ensayos de caracterización de Blas entre grupos extensos de microorganismos. Parece, por tanto, que disponemos de una herramienta eficaz en la búsqueda de nuevas Blas activas frente a los nuevos ABL.

Las características de inducibilidad de un enzima son parámetros positivos en la descripción y diferenciación de Blas, de

tal manera que los estudios de inducción se incluyen habitualmente tanto en la clasificación de *β*las, como en el análisis de nuevos ABL. La inducción es cuantificada por métodos espectrofotométricos o por la técnica del doble disco, después de crecer los microorganismos en presencia de substratos betalactámicos²⁰⁶. Una vez determinada la concentración idónea que proporciona la máxima inducción, y el tiempo en que se alcanza, se valora la diferencia en la producción de enzima antes y después de la inducción y se comparan los resultados. Los buenos inductores betalactámicos interaccionan con el enzima como substratos y como inhibidores, lo cual es preciso conocer como condición previa en los estudios de inducción.

Las reacciones inmunológicas entre *β*las detectadas utilizando antisueros policlonales, constituyen un instrumento eficaz aunque limitado en la diferenciación de *β*las²¹⁶. Los estudios de reactividad cruzada entre antisueros obtenidos con diferentes enzimas y *β*las concretas se han llevado a cabo mediante técnicas de inhibición de la actividad enzimática, métodos de inmunoprecipitación, inmunolectroforesis, e inmunoisoelectroenfoque. Para su desarrollo se precisan enzimas muy purificadas y a pesar de ello la especificidad conseguida no es muy elevada. Con esta tecnología se ha evidenciado la proximidad estructural entre diversas *β*las del tipo TEM, SHV, OXA y PSE.

El progreso espectacular de la genética molecular en los pasados 15 años, ha influido de manera prominente en la profundización que, tanto a nivel estructural como funcional, se ha producido en el conocimiento de las *β*las. La preparación de sondas ADN, la hibridación ADN-ADN, la moderna tecnología inherente a los ácidos nucleicos, la tipación con oligonucleótidos, la secuenciación de nucleótidos de los genes *β*la y la de aminoácidos de las propias proteínas, han completado los aspectos metodológicos aplicados a la caracterización de *β*las. Indudablemente el esfuerzo tecnológico realizado para la identificación y discriminación entre enzimas, ha discurrido de forma paralela a los "progresos bacterianos" en la evolución de sus mecanismos de resistencia a ABL.

La hibridación con sondas ADN no solamente ha facilitado el reconocimiento de secuencias ADN y genes, independientemente de su expresión, sino que ha permitido el hallazgo de nuevos genes

βla de resistencia, ha contribuido al análisis de su evolución, y ha clarificado la interrelación entre el amplísimo grupo de βlas plasmídicas y la posible derivación de alguna de ellas a expensas de enzimas inicialmente codificados por el cromosoma-21,207,216,240-242. La tecnología adecuada para la hibridación ADN-ADN se extrae de la referente a los ácidos nucleicos, y se basa en la capacidad de desnaturalización y renaturalización de la molécula de ADN, que permite que dos cadenas con secuencias de bases complementarias se reúnan para formar un híbrido. La posibilidad de marcar enzimáticamente o con radioisótopos una de las cadenas y la disponibilidad de un sistema de detección, completan los requerimientos metodológicos para identificar una diana génica mediante la hibridación.

Las sondas ADN están formadas por fragmentos, más o menos pequeños, de ADN de una sola cadena marcados con enzimas o radioisótopos, que permiten la unión a una secuencia complementaria con suficiente especificidad. En su elaboración, en muchas ocasiones "artesanal", se aísla la secuencia apropiada, se clona para disponer de material suficiente, y se marca para su posterior identificación. Las sondas de mayor tamaño adolecen, a veces, de especificidad, por lo que se hace preciso trabajar con oligonucleótidos que permitan la diferenciación entre estructuras genéticas, como las βlas TEM, que difieren entre uno y cinco nucleótidos. La hibridación con colonias resulta de especial utilidad cuando se pretende investigar con rapidez la presencia de alguna βla concreta entre un número elevado de microorganismos. La técnica de Southern-Transfer, a expensas de mayor lentitud goza de mucha más especificidad al hacer posible la localización del gen concreto bien sea cromosómico o plasmídico.

La hibridación ADN-ADN ha demostrado el alto grado de interrelación genética y la proximidad entre diversos grupos de βlas plasmídicas tanto tradicionales como de espectro ampliado^{207,-216}. Entre la primeras, se ha demostrado hibridación entre: TEM-1, TEM-2 y TLE-1; SHV-1 y 2; OXA-1 y OXA-4; OXA-2 y OXA-3; PSE-1, PSE-2 y CARB-3; y PSE-2 y OXA-6. La derivación por mutación a expensas de TEM-1 y 2 y SHV-1 de las nuevas βPEA y las escasas diferencias entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos observadas, han ratificado la enorme utilidad de esta técnica de caracterización. Jouvenot et al. comparan la eficacia del IEE y la hibridación con una sonda TEM-1 y analizan su

concordancia en la detección del enzima en 182 aislamientos clínicos²⁴³. En 158 se llega a la identificación por ambos métodos, mientras que 8 son positivos sólo para el IEE y 16 para la hibridación, probablemente por tratarse de genes silentes no expresados fenotípicamente. Huovinen et al. en una experiencia similar comparan el IEE con la hibridación de colonias usando sondas ADN de las siete *β*las plasmídicas más comunes²⁴⁴. Solamente encuentran seis falsos positivos y concluyen que la hibridación es un excelente procedimiento en la búsqueda rápida de *β*las en grupos amplios de bacterias.

La irrupción ininterrumpida de nuevas *β*PEA acaecida en los últimos 7 años ha cambiado sustancialmente el rendimiento de los métodos previos de caracterización de *β*las. La coincidencia de pIs y la homología estructural y genética entre enzimas ha impelido a la búsqueda de otras técnicas que, aisladamente o en solapamiento con las anteriores, faciliten la identificación enzimática. A finales de 1990, Mabilat y Courvalin publican los resultados del estudio con una nueva técnica de caracterización de *β*las - oligotipado - que hace posible la detección de mutaciones puntuales con oligonucleótidos²¹. El diseño de heptanucleótidos a expensas de TEM-1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 permite discriminar mutaciones puntuales en 5 locus genéticos y determinar, por hibridación de colonias, los perfiles de hibridación de 225 cepas de *Enterobacteriaceae* que sintetizan enzimas del tipo TEM, contribuyendo a la identificación de cada enzima. Los resultados son muy prometedores al conseguir no sólo la caracterización de nuevas variantes TEM, sino la ratificación de las escasas diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las 21 *β*las plasmídicas con estructura y propiedades TEM. En definitiva, esta técnica de oligotipado parece un paso progresivo muy significativo en la discriminación entre distintas *β*las plasmídicas.

La utilización combinada de: pI, perfiles de sustrato e inhibición, patrón de inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín, secuenciación de nucleótidos y aminoácidos y oligotipado, facilitará, en el futuro, la identificación de nuevas *β*las y la distinción entre enzimas que hoy no están definitivamente bien caracterizadas.

6.5 CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS.

Con independencia de las distintas perspectivas de aproximación al "universo de las β las", su estudio requiere establecer un sistema de clasificación que haga posible la adscripción de cada nueva enzima a grupos bien definidos. El diseño de un esquema racional de clasificación de β las ha sido una lógica pretensión de muchos investigadores relacionados, de una forma u otra, con estas enzimas. Los primeros intentos datan de los años iniciales de la década de 1960; no obstante, los sucesivos esquemas se han visto obstaculizados por el propio crecimiento del número de enzimas y por la complejidad de los criterios que progresivamente se han seguido para su caracterización y ordenamiento²³⁵. En principio, parece congruente discernir entre β las de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las primeras, mucho más reducidas en cuanto a su número, se constriñen, casi, a las enzimas de **Staphylococcus**. La clasificación de las β las de gram-negativos es mucho más ardua, y ha sido objeto de múltiples intentos de los que revisaremos los más relevantes.

En **Staphylococcus** es posible diferenciar cuatro β las distintas: A, B, C y D, atendiendo al pI y a criterios inmunológicos y enzimáticos²⁴⁵⁻²⁵⁰. Todas ellas son primariamente penicilinasas, aún con diferencias marcadas en la afinidad y estabilidad a distintos substratos betalactámicos, y con la excepción de las del tipo D son inducibles y extracelulares. Sus genes codificadores son portados en plásmidos pequeños que habitualmente se transfieren por transducción. No obstante, existen plásmidos mayores que además de codificar β las, contienen genes responsables de la resistencia a otros antimicrobianos^{251,252}. Estos plásmidos pueden ser transferidos por conjugación y se han encontrado tanto en **S. aureus** como en **S. epidermidis**.

La resistencia a ABL en **Streptococcus** y **Enterococcus** no es, habitualmente, debida a la síntesis de β las. En 1976, se publica el hallazgo de dos cepas productoras de β la, una en **S. uberis** y otra en **E. faecalis**²⁰². En 1983, se describe la primera β la plasmídica en **E. faecalis** HH-22²⁰⁵; desde entonces se han caracterizado en escasos aislamientos en Estados Unidos, Argentina y Líbano^{252,254}. Estas β las no han sido objeto de una clasificación especial, y su probable procedencia y relación con las de **Staphylococcus**, exime, de momento, de un ordenamiento dis-

tinto. Otras *β*-lactamas de gram-positivos, *Bacillus* y *Clostridium* tampoco han merecido una atención clasificatoria concreta y hasta muy recientemente no se han incluido en los esquemas habituales.

Los microorganismos gram-negativos producen una variedad mayor de *β*-lactamas cromosómicas y plasmídicas. El primer bosquejo de clasificación se debe a Ayliffe²⁵⁵ (1963), y es contemporáneo con el inicio del uso clínico de la ampicilina. Las diferencias en el perfil de sustrato suponen el parámetro esencial de los modelos de clasificación de Sawai et al.²⁵⁶ (1968) y Jack y Richmond²⁵⁷ (1970). Los primeros, diferencian tres grupos de *β*-lactamas que responden al perfil cefalosporinasas, amplio espectro, y penicilinasas, respectivamente. Jack y Richmond combinan la actividad hidrolítica con la movilidad electroforética y los datos incipientes sobre el perfil de inhibición. Caracterizan ocho enzimas diferentes que acomodan en cuatro grupos: 1) *β*-lactamas de amplio espectro; 2) penicilinasas; 3) cefalosporinasas con escasa o nula actividad penicilinasas; y 4) cefalosporinasas con alguna actividad penicilinasas.

Richmond y Sykes²¹¹ en 1973, conjugando datos relacionados con el perfil de sustrato, actividad de algunos inhibidores y codificación genética, consolidan una clasificación con cinco clases de *β*-lactamas de gram-negativos que ha hecho historia y es punto de referencia para cualquier ordenamiento posterior (Tabla 1). Con el tiempo esta clasificación universalmente seguida ha mostrado sus limitaciones. No obstante, ha sido la base para futuros intentos y aún hoy su terminología es tenida como punto de referencia.

La clase I, subdividida en cuatro subclases: a, b, c y d, incluye las *β*-lactamas de origen y codificación cromosómica, preferentemente activas frente a cefalosporinas, y en ella es posible diferenciar dos tipos en función de la expresión. La subclase b corresponde a las enzimas constitutivas de *E. coli* y *Shigella* con un nivel de producción muy bajo, que puede modificarse por mutación en el gen que codifica el enzima. Tal estado de desrepresión constitutiva afecta, en términos de resistencia clínica, a la mayoría de los ABL. Las subclases a y d engloban las *β*-lactamas inducibles de *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Providencia* y *Pseudomonas*. Tienen mayor repercusión en

la resistencia microbiana y desde 1980 son de plena actualidad, en relación con los fenómenos de inducción y desarrollo de resistencia "in vivo" a los ABL de 3ª generación. La subclase c está formada a expensas de un número reducido de β las inducibles caracterizadas más frecuentemente en *P. vulgaris*, e implicadas en la resistencia a cefotaxima y otras cefalosporinas relacionadas estructuralmente.

La clase II la integran un escaso número de enzimas cromosómicas, con actividad primordialmente penicilinasas y de nula relevancia clínica. Se diferencian dos subclases a y b en base a la movilidad electroforética y sólo fueron identificadas en *P. mirabilis* y *E. coli*. La clase IV está formada por un número relativamente pequeño de enzimas de origen cromosómico agrupadas en tres subclases: a, b y c por su movilidad, identificadas de manera más específica en *Klebsiella*. Aunque se consideran β las de amplio espectro, dan lugar a un fenotipo de sensibilidad caracterizado por valores intermedios de resistencia a ampicilina y carbenicilina, y en ocasiones son las responsables de la resistencia a los antibióticos monobactámicos desarrollados con posterioridad.

Las clases III y V de la clasificación de Richmond y Sykes incluyen exclusivamente β las de carácter plasmídico. En la clase III un enzima, TEM-1, de marcada significación clínica por su extensa distribución en gram-negativos y por conferir resistencia a ampicilina, carbenicilina y en ocasiones, dependiendo del nivel de producción, a las cefalosporinas de la 1ª generación de amplio uso en aquellos momentos. Esta β la es la de mayor trascendencia biológica y clínica de las existentes y ha dado lugar posteriormente a una familia muy extensa con implicaciones sumamente relevantes. En la clase V, subdividida en cuatro subclases: a, b, c y d, se incluyen el resto de las β las plasmídicas de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* conocidas hasta el momento. Las subclases a y b hidrolizan cloxacilina con mayor eficacia que penicilina, mientras que c y d son poco activas sobre cloxacilina y tampoco son inhibidas por ese compuesto.

La descripción por Matthew et al.²⁰⁰ en 1975, de la técnica de caracterización de β las basada en la determinación del pI por IEE, supone un impulso definitivo para la clasificación de estas enzimas de gram-negativos. Sin duda es el "punto de arran-

que" de un corto periodo de cinco años en el que se suceden distintos intentos de adecuar la clasificación de Richmond y Sykes a la realidad demandada por el hallazgo de nuevas enzimas. Sykes y Matthew²⁰⁹ (1976), proponen una nueva clasificación considerando el pI, el perfil de sustrato y la codificación genética de cada enzima. Mitsuhashi et al.²⁵⁸ (1977), clasifican las *β*-las plasmídicas en cuatro tipos: I) TEM; II) oxacilinasas que hidrolizan también la meticilina; III) oxacilinasas inactivas frente a meticilina; y IV) *β*-las de *P. aeruginosa*. En 1979, Matthew²⁰³ y Matthew et al.²⁵⁹ describen once tipos de *β*-las plasmídicas en gram-negativos y las agrupan en tres clases diferentes en relación directa con su perfil hidrolítico. Así quedan reseñadas en la literatura científica, las *β*-las de amplio espectro que hidrolizan de forma equivalente penicilina y cefaloridina; las oxacilinasas que hidrolizan eficazmente oxacilina y otros sustratos relacionados; y las carbenicilinasas o *β*-las que hidrolizan la carbenicilina y otras penicilinas semisintéticas desarrolladas con posterioridad.

Tácitamente se configura una clasificación que respetando en cierta forma el esquema de Richmond y Sykes de 1973, divide inicialmente las *β*-las de gram-negativos en dos grandes grupos: A) cromosómicas y B) plasmídicas, subdivididas a su vez en lo que podrían ser seis clases bien diferenciadas (Tabla 2). Entre las *β*-las cromosómicas se distinguen las clases: a) penicilinasas; b) cefalosporinasas y c) de amplio espectro, que mantienen el esquema inicial de Richmond y Sykes con las propiedades enunciadas por ellos. Las *β*-las plasmídicas se distribuyen en tres clases: a) que acoge a TEM-1, TEM-2, SHV-1 y HMS-1; b) reservada para las isoxazolilpenicilinasas, OXA-1, OXA-2 y OXA-3; y c) en la que se disponen las carbenicilinasas, PSE-1, PSE-2, PSE-3 y PSE-4, específicas entonces de *P. aeruginosa* y más tarde encontradas en **Enterobacteriaceae**.

De estos esquemas, que consideran esencialmente propiedades físicas y bioquímicas, se distancian algunos proyectos de clasificación surgidos a partir de 1980, basados primordialmente en las características estructurales de las *β*-las como proteínas. Ambler²¹⁷ (1980) y Jaurin y Gundstrom²¹⁸ (1981), distinguen tres clases de *β*-las. La clase A, con un residuo serina en su centro activo, está formada por enzimas de peso molecular próximo a 28.000, cuyos representantes más genuinos son la penici-

linasa de *S. aureus* PC1, el enzima de *B. licheniformis* 749/C y la β la TEM-1 de gram-negativos. En la clase B, metaloenzimas de peso molecular 23.000, está incluida la cefalosporinasa de *B. cereus*, especie de escaso significado clínico. Las cefalosporinasas cromosómicas de gram-negativos integran la clase C, con la β la AmpC de *E. coli* como enzima representativa. También se consideran miembros de la misma otras cefalosporinasas con diferente grado de homología con la anterior, como las enzimas cromosómicas de *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas*. Recientemente, los trabajos de Huovinen et al.²²⁰ y Oullette et al.²⁶⁰ han propiciado la posibilidad de constituir la clase D en la que tendrían cabida OXA-1 y OXA-2, con escasa homología con el resto de las oxacilinasas. Indudablemente, la estructuración de β las a nivel molecular es la vía de futuro para la clasificación más congruente. Por el momento, son pocas las β las así clasificadas, aunque la progresión de la tecnología molecular facilitará considerables avances en los próximos años.

La década que comienza en 1980 es prolífica en hallazgos en el campo de las β las y su interrelación con los nuevos ABL. Se caracterizan un elevado número de enzimas plasmídicas y se profundiza en los mecanismos de resistencia planteados por las β las cromosómicas inducibles, en relación con las cefalosporinas de 3ª generación, monobactams y carbapenems. Como colofón de múltiples estudios propios y de otros investigadores, Medeiros^{261,216} (1984, 1989) y Medeiros y Jacoby²⁶² (1986), publican tres excelentes revisiones que recogen el notable incremento producido en el número de β las plasmídicas. Configuran cuatro clases en la línea clasificatoria seguida hasta entonces (Tabla 3). A las conocidas β las de amplio espectro TEM-1,2 y SHV-1, añaden otras de tipo TEM, TLE-1, TLE-2, ROB-1, LCR-1 y OHIO-1, identificadas en estudios realizados en Brasil y EE.UU, fundamentalmente, en cepas de *E. coli*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y *E. cloacae*. En la segunda clase, oxacilinasas, añaden a las ya conocidas OXA-1,2 y 3, las nuevas OXA-4,5,6 y 7 de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, alguna de las cuales hidrolizan las cefalosporinas de 3ª generación. En la clase carbenicilinasas incluyen seis nuevas β las; CARB-3 de *P. aeruginosa*, AER-1 de *A. hydrophila*, SAR-1 de *V. cholerae*, BRO-1 de *M. catarrhalis*, y dos enzimas todavía por nombrar, N-3 y N-29, raramente encontradas en aislamientos de *P. mirabilis*. Como novedad se

abre una nueva clase, cefalosporinasa o tipo ampC, configurada por *β*las plasmídicas, CEP-1 y CEP-2 de *P. mirabilis* y *Achromobacter*, con perfil de sustrato claramente identificado como de cefalosporinasas por vez primera entre las *β*las plasmídicas.

Los esquemas de clasificación de las *β*las cromosómicas han estado, en cierta medida, condicionados al interés que en cada momento ha despertado su participación en la resistencia. El cromosoma bacteriano, como estructura genética que promueve la síntesis de *β*las da lugar a un heterogéneo grupo de enzimas, a cuya multiplicidad responden la diversidad de propiedades enzimáticas y el abanico de posibilidades de inactivación de ABL. Virtualmente, todas las bacterias gram-negativas producen una *β*la cromosómica específica de especie y, a veces, de subespecie²⁰⁹. La homología genética entre estas enzimas parece elevada, sugiriendo un origen evolutivo común, y tal vez punto de partida de *β*las plasmídicas²⁶³. Aunque todavía no se ha concretado su posible función fisiológica en muchas bacterias, en otros casos está bien delimitada su responsabilidad en la resistencia y en el fracaso terapéutico.

Dos criterios fundamentales facilitan la clasificación de las *β*las de origen cromosómico: la estructura molecular y las características fisico-químicas y cinéticas de las enzimas. Mitsuhashi e Inoue²⁶⁴ (1981) diferencian dos grupos de *β*las cromosómicas atendiendo al perfil de sustrato: cefalosporinasas constitutivas e inducibles que se corresponderían con las subclases Ib, Ia y Id de Richmond y Sykes, y cefuroximasas constitutivas e inducibles que podrían equipararse a la clase Ic. A efectos prácticos y sin un afán estrictamente clasificatorio, Sanders²⁰⁶ (1989), establece un esquema muy congruente dividido en cuatro grupos, que permite el análisis de los tipos más comunes entre las *β*las cromosómicas (Tabla 4).

El primer grupo, denominado genéricamente cefalosporinasas, contiene la mayoría de las *β*las cromosómicas y es subdividido en constitutivas e inducibles atendiendo a su expresión. Las *β*las cromosómicas constitutivas, clase Ib de Richmond y Sykes, incluyen las enzimas de *E. coli*, *Shigella* y *Proteus*, cuyo nivel de producción habitualmente bajo no ocasiona resistencia importante a ABL, sino a expensas de mutaciones en el operón *β*la que causan incrementos más o menos significativos de la tasa de

producción enzimática²⁶⁵. Las β las cromosómicas inducibles, de mayor repercusión en la resistencia, han sido bien caracterizadas en *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*, y *Pseudomonas*, están presentes en más del 90% de los aislamientos, y corresponden a las clases Ia y Id de Richmond y Sykes. Su síntesis es susceptible de modificarse, incrementándose, por mecanismos de inducción con substratos betalactámicos y no betalactámicos, o por fenómenos de mutación genética²⁶⁶⁻²⁶⁸. Ambos se dan en idénticos microorganismos, de forma que la población capaz de ser inducida transitoriamente en su producción de β la, alberga mutantes en proporción que oscila entre 10^{-5} y 10^{-8} con producción desreprimida, elevada y estable del enzima. Estos mutantes pueden hacerse dominantes entre la población bacteriana como consecuencia de la selección "in vivo" por el tratamiento con algunos ABL⁸⁰. Así se llega a la resistencia clínica múltiple y al fracaso terapéutico en el 10-50% de los pacientes infectados con estas especies^{266,269-271}.

El segundo grupo, oxiiminocefalosporinasas, inactivan las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación con un grupo oxiimino en su molécula. De nuevo la expresión genética constitutiva o inducible condiciona dos entidades con personalidad propia, que asientan sobre géneros bacterianos distintos. Las oxiiminocefalosporinasas constitutivas son responsables, en cierta medida, de la resistencia a ABL de *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. thetaiotaomicrom*. El segundo grupo, oxiiminocefalosporinasas inducibles, fueron referidas en el pasado como subclase Ic por Richmond y Sykes, y también como cefuroximasas⁷⁵. Caracterizadas en principio en *P. vulgaris*, más tarde se identificaron también en *P. penneri*, *P. cepacia*, *P. pseudomallei* y *X. maltophilia*. Su participación en la resistencia, importante por el patrón hidrolítico, está condicionada por su baja incidencia en los microorganismos en que se han caracterizado y por la infrecuencia de los mismos en la patología infecciosa.

El grupo tercero, penicilinasas cromosómicas, referido en la clasificación de Richmond y Sykes como clase II, ha quedado reducido en la actualidad a un único enzima identificado en *A. faecalis*. En el último grupo se diferencian metaloenzimas y las β las cromosómicas de *Klebsiella*. Las primeras son enzimas de amplio espectro que requieren metales divalentes para ejercer su actividad y que conforman en exclusiva la clase molecu-

lar B. A la enzima de *B. cereus* II, se han añadido la β la L1 de *X. maltophilia*, inducible y responsable de la resistencia a imipenem, aunque no hidroliza moxalactam ni aztreonam, y otras caracterizadas en *F. odoratum*, *L. gormanii* y *B. fragilis*. De nuevo la incidencia reducida de muchos de estos microorganismos como causa de infección limita su repercusión en la resistencia clínica. En *Klebsiella*, se han identificado β las cromosómicas, similares en sus propiedades, en tres especies muy relacionadas a nivel bioquímico: *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Se trata de enzimas con pI que varía entre 4.9 y 6.8, aunque para algunas se han reportado valores de 7.2 y 7.7, originalmente incluidas por Richmond y Sykes en la clase IV. Son consideradas de amplio espectro, si bien hidrolizan con mayor eficacia las penicilinas, circunstancia que queda reflejada en las pruebas de sensibilidad. Alguna de estas enzimas encontradas esporádicamente en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, entre ellas la denominada K1, disponen de mayor perfil hidrolítico que atañe también a oxiiminocefalosporinas y aztreonam, excluyendo cefamicinas, ceftazidima, moxalactam e imipenem^{272,273}.

La combinación de parámetros bioquímicos y físicos, y la estructura molecular de las β las, parecen ofrecer las mayores posibilidades para lograr un esquema clasificatorio con "sitio" suficiente para aceptar las nuevas enzimas. Bush²⁷⁴ (1988) diseña un esquema previo a su propuesta de clasificación publicada en 1989^{235,275,276}, que por el momento supone el proyecto más ambicioso y mejor estructurado de clasificación de β las (Tabla 5). Establece cuatro grandes grupos atendiendo, esencialmente, al perfil de sustrato, a la actividad inhibitoria de a. clavulánico y EDTA, y en cierta medida a la codificación genética. Todos los grupos son homogéneos y constituidos por un subgrupo, a excepción del grupo 2 subdividido en seis subgrupos diferentes atendiendo, sobre todo, al patrón hidrolítico.

En el grupo 1, CEP-N, cefalosporinasas de gram-negativos no inhibidas por el a. clavulánico, se integran un amplio grupo de enzimas cromosómicas en su mayoría, que se correlacionan bien con las que forman la clase Ia, Ib y Id de Richmond y Sykes, y con el grupo 1 de Sanders. Estas enzimas de pI básico, hidrolizan cefaloridina y cefalotina mucho más rápidamente que penicilina, y son inhibidas por cloxacilina y aztreonam. Todas las

enzimas de este grupo estudiadas a nivel molecular pertenecen a la clase C.

El grupo 2 se subdivide en seis subgrupos debido a la heterogeneidad de los perfiles de sustrato. Se trata de β las con gran afinidad por el a. clavulánico, pertenecientes a la clase molecular A y en su mayor parte de síntesis plasmídica. El subgrupo 2a, PEN-Y, lo integran las penicilinasas de gram-positivos, con mención especial para las enzimas de *S. aureus*. Al subgrupo 2b, BDS-Y, pertenecen las numerosas β las de amplio espectro de gram-negativos, representadas por las muy difundidas TEM-1,2 y SHV-1. Son más eficientemente inhibidas por el a. clavulánico que por la cloxacilina y el aztreonam, e hidrolizan muy someramente los nuevos betalactámicos sobre todo cuando son producidas a elevado nivel.

El subgrupo 2b', EBS-Y, está formado por las nuevas β las plasmídicas de espectro ampliado, de aparición reciente en *Enterobacteriaceae*, que hidrolizan las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam y son eficazmente inhibidas por a. clavulánico, tazobactam y sulbactam. Desde 1989 se han caracterizado un gran número de nuevas enzimas con amplísimo espectro que no están, obviamente, recogidas en este esquema y que han sido clasificadas por Jacoby y Medeiros recientemente²⁷⁷ (Tabla 6). Un primer tipo lo forman las aminotiazolidil-oxiimino β las, derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación y los antibióticos monobactámicos. No incluyen en su espectro las cefamicinas, moxalactam, ni los carbapenems y son inhibidas por a. clavulánico, sulbactam y tazobactam. También serían susceptibles de inclusión un extenso conjunto de enzimas de tipo TEM, que por el momento no han sido individualizadas definitivamente, algunas de las cuales podrían ser similares a otras previamente descritas. La extensión del espectro hidrolítico a metoxi-betalactámicos y carbapenems, origina la creación de otras dos entidades con personalidad propia, cefamicinasas y carbapenemasas, en las que tendrían lugar las β las CMY-1,2, MIR-1 y la única β la plasmídica de espectro ampliado descrita en *P. aeruginosa*. Sobre ellas apenas tienen poder inhibitorio los inhibidores betalactámicos clásicos, y su diseminación ocasionaría un grave problema en función de las escasas alternativas terapéuticas que permite un espectro casi total en relación con los ABL.

Los subgrupos 2c, CAR-Y, y 2d, CLX-Y, no ofrecen novedades importantes y corresponden a las carbenicilinasas y oxacilinasas descritas con anterioridad, también asignadas a la clase molecular A. Mientras que las primeras son bien inhibidas por el a. clavulánico, las oxacilinasas son más resistentes a casi todos los inhibidores betalactámicos incluyendo cloxacilina y aztreonam. El grupo 2e, CEP-Y, reúne un conjunto de cefalosporinasas equiparables a las que forman la subclase Ic de Richmond y Sykes y el grupo 2 de Sanders, caracterizadas por su actividad hidrolítica sobre oximinocefalosporinas y por ser inhibidas por concentraciones bajas de a. clavulánico. Las βlas de *P. vulgaris* activas frente a la cefotaxima y otros ABL relacionados estructuralmente, y la βla L2 de *X. maltophilia* son los representantes más caracterizados del grupo.

El grupo 3, MET-N, lo constituyen metaloenzimas no inhibidos por el a. clavulánico y sí por el EDTA, cuya actividad es recuperada después de la adición de cationes divalentes. Son equiparables a las enzimas del grupo 4 de Sanders, de las que la βla II de *B. cereus* prototipo de la clase molecular B, y las enzimas de *Flavobacterium* activas frente a imipenem y meropenem son las más representativas. El cuarto grupo, PEN-N, lo conforman βlas con perfil penicilinasas no inhibidas por el a. clavulánico, cuya adscripción molecular es desconocida por el momento. Se trata de un grupo reducido de enzimas cromosómicas, a excepción de la βla plasmídica LCR-1, con escasa repercusión clínica.

En resumen, han sido numerosos las propuestas de clasificación de betalactamasas, de las que hemos revisado las más relevantes. El último esquema diseñado por Bush (1989), aún con ciertas objeciones, podría satisfacer las necesidades planteadas hasta ese momento. La proliferación de nuevas βlas desde entonces, la dilucidación de la estructura molecular de antiguas y recientes enzimas, y el desarrollo de otros criterios de caracterización enzimática, obligará, en un futuro cercano, a abordar el problema con alguna perspectiva diferente.

TABLA 1.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS.

<u>Esquema de Richmond MH. y Sykes RB. (1973).</u>			
- Clase I	Cefalosporinasas Cromosómicas	a) Inducible: b) Constitutiva: c) Inducible: d) Inducible:	E. cloacae. E. coli. P. vulgaris. P. aeruginosa.
- Clase II	Penicilinasas Cromosómicas	a) b)	E. coli. P. mirabilis.
- Clase IV	Amplio espectro Cromosómicas		Klebsiella spp.
- Clase III	Amplio espectro Plasmídicas	TEM-1.	Enterobacteriaceae.
- Clase V	Amplio espectro Plasmídicas	a),b) c),d)	Cloxacilinasas. no Cloxacilinasas.

TABLA 2.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS.

<u>Esquemas de Sykes RB y Matthew M. (1976), Matthew M. (1979) y Matthew et al. (1979).</u>			
A) Cromosómicas -	a) Penicilinasas b) Cefalosporinasas c) Amplio espectro	(Clase II R/S)* (Clase I R/S) (Clase IV R/S)	
B) Plasmídicas -	a) Amplio espectro b) Oxacilinasas c) Carbenicilinasas	TEM-1, TEM-2. SHV-1, HMS-1. OXA-1,2,3. PSE-1,2,3,4.	

* R/S: Richmond y Sykes.

TABLA 3.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS PLASMIDICAS.**Esquemas de Medeiros A. (1984, 1989), Medeiros A. y Jacoby G. (1986).**

<u>Betalactamasa</u>	<u>Microorganismos</u>	<u>Prevalencia</u>
<u>Amplio espectro</u>		
TEM-1	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa	+++*
	H. influenzae, N. gonorrhoeae	++
	N. meningitidis, V. cholerae	±
TEM-2	Enterobacteriaceae	++
SHV-1	Enterobacteriaceae	++
HMS-1	Enterobacteriaceae	±
TLE-1	E. coli	±
TLE-2	K. pneumoniae	±
LCR-1	P. aeruginosa	±
OHIO-1	Enterobacteriaceae	+
NPS-1	P. aeruginosa	±
LXA-1	Enterobacteriaceae	+
ROB-1	H. influenzae, H. pleuropneumoniae	+
	P. multocida	±
<u>Oxacilinasas</u>		
OXA-1	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa	++
OXA-2	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa	++
OXA-3	Enterobacteriaceae, P. aeruginosa	+
OXA-4	Enterobacteriaceae	±
OXA-5	P. aeruginosa	±
OXA-6	P. aeruginosa	±
OXA-7	E. coli	±
SN (GN11499)	B. fragilis	±
<u>Carbenicilinasas</u>		
PSE-1 (CARB-2)	P. aeruginosa, Enterobacteriaceae	++
PSE-2	P. aeruginosa, Enterobacteriaceae	+
PSE-3	P. aeruginosa, Enterobacteriaceae	+
PSE-4 (CARB-1)	P. aeruginosa, Enterobacteriaceae	+
CARB-3	P. aeruginosa	±
CARB-4	P. aeruginosa	±
AER-1	A. hydrophila	±
SAR-1	V. cholerae	±
BRO-1	M. catarrhalis	++
SN (N-3)	P. mirabilis	±
SN (N-29)	P. mirabilis	±
<u>Cefalosporinasas</u>		
CEP-1	P. mirabilis	±
CEP-2	Achromobacter	±

* +++ Muy frecuente; ++ Frecuente; + Infrecuente, ± Muy infrecuente.

TABLA 4.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS.**Esquema de Sanders CC. (1989).**

- A) Cromosómicas
- 1) Cefalosporinasas
 - constitutivas (Ib R/S)*
 - inducibles (Ia, Id R/S)
 - 2) Oxiiminocefalosporinasas
 - constitutivas
 - inducibles (Ic R/S)
 - Cefuroximasas
 - 3) Penicilinasas
 - (II R/S)
 - 4) Metaloenzimas.
 - Betalactamasas de Klebsiella
 - (IV de R/S)

* R/S: Richmond y Sykes.

TABLA 5.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS.**Esquema de Bush K. (1973).**

GRUPO	SUBTITULO	SUBSTRATO	INHIBICION		ENZIMAS REPRESENTATIVAS	
			CLAV	EDTA		
1	CEP-N	Cefalosporinas	No	No	Ia, Ib, Id (R/S)*	Gram(-)
2a	PEN-Y	Penicilinas	Si	No	S. aureus PC1	Gram(+)
2b	BDS-Y	Penicilinas	Si	No	TEM-1, 2 SHV-1	Gram(-)
		Cefalosporinas				
2b'	EBS-Y	Penicilinas	Si	No	TEM-3, 21	Gram(-)
		Cefalosporinas				
		Monobactams				
2c	CAR-Y	Penicilinas	Si	No	PSE-1, 3, 4	Gram(-)
		Carbenicilina				
2d	CLX-Y	Penicilinas	Si	No	OXA-1, 2, 3, 4	Gram(-)
		Cloxacilina				
2e	CEP-Y	Cefalosporinas	Si	No	Ic (R/S)	Gram(-)
3	MET-N	Variable	No	Si	Metaloenzimas	Gram(+/-)
4	PEN-N	Penicilinas	No	?	Bacteroides	Gram(-)
					P. cepacia	

* R/S: Richmond y Sykes.

TABLA 6.- CLASIFICACION DE BETALACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

Esquema de de Jacoby G. y Medeiros A. (1991).

<u>Betalactamasa</u>	<u>Microorganismo</u>	<u>PI</u>	<u>Betalactamasa</u>	<u>Microorganismo</u>	<u>PI</u>
<u>I Oxiimino betalactamasas.</u>			<u>IV Sin individualizar definitivamente.</u>		
TEM-3 (CTX-1)	K. pneumoniae	6.3	TEM-20	K. pneumoniae	5.4
TEM-4	E. coli	5.9	TEM-21	K. pneumoniae	6.4
TEM-5 (CAZ-1)	K. pneumoniae	5.55	TEM-E1	E. coli	5.41
TEM-6	E. coli	5.9	TEM-E4		5.61
TEM-7 (TEM-201)	C. freundii	5.41	CAZ-2	K. pneumoniae	6.0
TEM-8	K. pneumoniae	5.9	CAZ-3 (TEM-E2)	K. pneumoniae	5.3
TEM-9 (RHH-1)	K. pneumoniae	5.5	CAZ-6	K. pneumoniae	6.5
TEM-10 (TEM-E3)	K. pneumoniae	5.57	CAZ-7	K. pneumoniae	6.3
TEM-11 (CAZ-lo)	K. pneumoniae	5.6	CAZ-hi	K. pneumoniae	6.5
TEM-12 (TEM-101)	E. coli	5.25	MGH-1	K. pneumoniae	5.55
TEM-13	M. morganii	5.6	MRH-1	K. pneumoniae	5.44
TEM-14	K. pneumoniae	6.3	YOU-1	K. pneumoniae	5.57
TEM-15	K. pneumoniae	6.0	YOU-2	K. pneumoniae	5.2
TEM-16	K. pneumoniae	6.3	CTX-2	S. mbandaka	5.3
TEM-17	K. pneumoniae	5.9	SN	K. pneumoniae	5.2
TEM-18	K. pneumoniae	6.3	SN	E. cloacae	5.7-5.9
TEM-19	E. coli	5.4	SN	E. coli	5.2
			SN	K. pneumoniae	?
SHV-2	K. ozenae	7.6	SN	K. pneumoniae	5.35
SHV-3	K. pneumoniae	6.98	SN	K. pneumoniae	5.1
SHV-4 (CAZ-5)	K. pneumoniae	7.8			
SHV-5 (CAZ-4)	K. pneumoniae	8.2			
<u>II Cefamicinasas.</u>			<u>V Sin caracterizar definitivamente.</u>		
CMY-1	K. pneumoniae	8.0	MJ-1	K. oxytoca	5.35
CMY-2 (HEL-1)	K. pneumoniae	8.1	MJ-2	C. amalonaticus	5.55
MIR-1	K. pneumoniae	8.4	FUR	K. pneumoniae	7.5
			FEC-1	E. coli	8.2
<u>III Carbapenemasa.</u>			DJP-1	K. pneumoniae	7.9
SN*	P. aeruginosa	9.0	MEN-1	K. pneumoniae	8.4
			CTX-M	E. coli	8.9
			BIL-1	E. coli	8.8
			SN	K. pneumoniae	7.65
			SN	K. pneumoniae	7.0-7.8

* SN: Sin nombrar.

6.6 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS DE GRAM-NEGATIVOS.

La variabilidad genética y las amplias posibilidades de transformación que permite son los pilares en los que se sustentan la evolución del universo microbiano, y naturalmente, la adecuación progresiva de los mecanismos de resistencia bacterianos a la convivencia o tolerancia con el ambiente creado por los antimicrobianos.

Las β las plasmídicas son, tal vez, el mejor ejemplo de la rentabilidad facilitada por esa variabilidad genética. Conforman un extenso grupo de enzimas determinadas por genes contenidos en plásmidos y transposones, que transfieren la resistencia a ABL de unas bacterias a otras, definiendo el mejor exponente de diseminación de la resistencia. Son, por tanto, un conjunto de proteínas muy diverso, que han puesto de manifiesto a lo largo del tiempo su capacidad de evolución hacia estructuras nuevas o modificadas, capaces de inactivar los ABL en la medida que se iban incorporando a los formularios terapéuticos.

De la misma manera que se tiene constancia de la existencia de los plásmidos con antelación al desarrollo de la quimioterapia antimicrobiana²⁷⁸, es muy posible que las β las plasmídicas también antecederan al empleo de la penicilina. Inicialmente, la β la estafilocócica es la primera enzima plasmídica con repercusión importante en la antibioterapia. La búsqueda de nuevos ABL y el desarrollo de la meticilina y las primeras cefalosporinas, obedece a la necesidad de encontrar alternativas válidas en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* productor de β la y resistente a penicilina. Poco después, en 1965, Datta y Kontomichalou¹⁹⁸ revelan la síntesis de TEM-1 en *Enterobacteriaceae* confirmando experimentalmente tesis esbozadas muchos años antes. Desde entonces, las β las de gram-negativos constituyen un mecanismo de resistencia de primera magnitud, a cuya resolución han ido dirigidos los mayores esfuerzos en el diseño de antimicrobianos. Como consecuencia de esta competencia, de la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos, e indudablemente, de los progresos en la caracterización enzimática, hoy somos capaces de reconocer más de 75 enzimas determinadas genéticamente por elementos extracromosómicos.

La codificación de β las por plásmidos y transposones asegura

que un enzima originalmente confinado en una especie, aparezca con posterioridad en especies o grupos de bacterias próximos. A este respecto conviene puntualizar las dificultades de transferencia plasmídica entre bacterias no muy relacionadas. La falta de similitud entre plásmidos de gram-positivos y gram-negativos, e incluso las dificultades de transferencia de los marcadores de resistencia entre microorganismos facultativos y anaerobios estrictos, son los determinantes de las divergencias entre las β las de los distintos grupos de microorganismos.

Los plásmidos son considerados, en consecuencia, como agentes importantes en la evolución genética y en la diseminación de genes de resistencia. Conceptualmente, como sabemos, los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos constituidos por moléculas de ADN circular de doble banda, con tamaños que oscilan entre 10 y 400 kilobases²⁷⁹. Son estructuras autónomas en cuanto que se autoduplican de forma independiente, si bien requieren un origen de replicación y una región esencial para su mantenimiento estable en la bacteria. La transferencia de ADN plasmídico entre bacterias es un complejo proceso, por lo que los plásmidos conjugativos que la posibilitan tienden a tener mayor tamaño, requiriendo genes adicionales para la iniciación de la autotransferencia²⁸⁰. En una bacteria pueden hallarse múltiples copias de un mismo plásmido, o pueden coexistir diferentes plásmidos siempre que pertenezcan a distinto grupo de incompatibilidad.

Las propiedades de los plásmidos como elementos diversificadores de la resistencia inciden claramente en la distribución de las distintas β las entre la población bacteriana²⁶². A este propósito, las más relevantes son la ya referida autotransferencia y el perfil o rango de huéspedes que alberga cada plásmido. Aquella β la encontrada en múltiples y diferentes microorganismos sin duda debe ser codificada por muchos tipos de plásmidos; en el polo opuesto enzimas de limitada difusión serán codificadas por plásmidos con un perfil restringido. En definitiva, la epidemiología de cada plásmido interviene decisivamente en la difusión de cada β la entre la población patógena y en la repercusión clínica de cada una de las diferentes enzimas.

La distribución de β las en diferentes tipos de plásmidos ha sido investigada tanto en *Enterobacteriaceae* como en *P. aeruginosa*.

sa^{203,281,282}. . A este respecto, el primer trabajo y el más esclarecedor es el publicado por Matthew en 1979, que analiza los resultados de un estudio de distribución de 11 βlas plasmídicas en 363 plásmidos de gram-negativos²⁰³. TEM-1 era la βla más frecuentemente especificada, en 62% de plásmidos pertenecientes a 18 grupos de incompatibilidad, lo que viene a corroborar su relevancia en la resistencia a ABL. TEM-2 era elaborada por el 15,4% de plásmidos pertenecientes a 7 grupos diferentes. El resto de enzimas mostraban menor índice de prevalencia con valores en orden decreciente para OXA-1 (8,8%), OXA-2 (4,7%), SHV-1 (4,1%), OXA-3 (1,9%). HMS-1, una βla muy infrecuentemente encontrada, era especificada solamente por un plásmido. Las βlas PSE, especialmente activas frente a carbenicilina inicialmente restringidas a *P. aeruginosa*, se han hallado posteriormente en algunas **Enterobacteriaceae**. Las características de los plásmidos que las codificaban concuerdan y explican la epidemiología de estas enzimas.

La amplia distribución de genes de resistencia a ABL entre los microorganismos patógenos, no se puede explicar satisfactoriamente atribuyéndola en exclusiva a plásmidos de resistencia. Hedges y Jacob en 1974, demostraron que los determinantes específicos de la βla TEM-2 eran portados en fragmentos pequeños de ADN capaces de pasar o transponerse del cromosoma a otro replicón, acuñando para ellos el nombre de transposones (Tn)¹⁹⁹. Posteriormente, se ha preferido la denominación más amplia de elementos genéticos de transposición, que incluyen también secuencias de inserción, restringiendo el término transposones para aquellos que median características fenotípicas reconocibles como marcadores de resistencia a antibióticos.

Los transposones son fragmentos pequeños de ADN que contienen marcadores de resistencia a antimicrobianos y son capaces de pasar de un área a otra del cromosoma, de éste a un plásmido, y también a un bacteriófago. Poseen un sistema especializado de recombinación genética, independiente del sistema general que clásicamente permite la recombinación de secuencias homólogas de ADN por entrecruzamiento. Esta recombinación ocurre al azar entre secuencias no homólogas y da lugar a modificaciones importantes en secuencias de ADN mayores. La transposición origina una replicación del elemento de transposición desde la secuencia de ADN del donador, y la inserción de una copia del

transposón en la secuencia de ADN del receptor. Es importante que la replicación acompañe a la transposición, de manera que la integración del transposón en un sitio nuevo no signifique su pérdida del lugar original.

La frecuencia de transposición está condicionada por algunos factores. El tamaño del transposón se relaciona inversamente con dicha frecuencia, de forma que fragmentos mayores de 5 Kb pueden satisfacer, por su tamaño, un precio en términos de transponibilidad. En sentido opuesto, los elementos de transposición de mayor tamaño pueden albergar otros determinantes de resistencia a antibióticos no relacionados estructuralmente. Ello explicaría que la selección de cepas resistentes por un antimicrobiano o grupo de antimicrobianos concretos, ocasionara al unísono la selección de cepas resistentes a familias de antibióticos distantes. La transposición es un fenómeno continuo "en y entre" las diversas poblaciones bacterianas. Cualquier transposón puede integrarse en cualquier otro replicón, plásmido, bacteriófago ó ADN cromosómico. Los transposones son esenciales en la evolución de los plásmidos de resistencia que portan múltiples determinantes de resistencia a antimicrobianos.

En la actualidad, 12 βlas plasmídicas son codificadas por transposones²¹⁶, mientras que no se ha podido demostrar, por el momento, la transponibilidad de los genes que codifican las nuevas βlas plasmídicas de espectro ampliado. Entre ellas, TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1, OXA-2 y PSE-1, que son las enzimas más frecuentemente encontradas entre los microorganismos patógenos. La transponibilidad de los genes βla contribuye a explicar su distribución en plásmidos diferentes, la síntesis de una misma βla por el cromosoma y por un plásmido, y en definitiva la diseminación extensa de alguna de las βlas entre la población bacteriana.

Los transposones Tn3 y Tn1 responsables de la codificación de TEM-1 y TEM-2 respectivamente, han sido estudiados en profundidad^{283,284}. Ambos son muy similares y constituyen unidades de 5 Kb con 3 sitios y 2 genes esenciales para la transposición: *tnpA* que determina el enzima transposasa involucrada en la replicación y *tnpR* responsable de un producto que regula la expresión del anterior. TEM-1, además, es especificada por otros transposones de mayor tamaño, Tn4, TnAB, Tn1699, y Tn1700. Los

transposones Tn3 y Tn1 muestran 85% de homología ADN, y parece verosímil que tras la incorporación del gen *Bla* al transposón una mutación determine la modificación de un aminoácido en la secuencia, el cambio de pI y las variaciones que en la eficiencia hidrolítica y en el perfil de sustrato se observan entre ambos enzimas. Por otra parte, la incorporación del gen *Bla* en distintos transposones tendría su reflejo en la distribución de TEM-1 en plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad, así como en la diseminación del enzima en grupos diferentes de microorganismos como *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus* y *Neisseria*. Todos los transposones que gobiernan la síntesis de *Bla*s, excepto Tn1, Tn3 y el que codifica SHV-1, portan otros determinantes de resistencia a diferentes antimicrobianos, aunque no se conoce bien la forma en que los genes *Bla* han llegado a incorporarse a transposones de multiresistencia²⁶².

En síntesis, las enormes posibilidades que para el desarrollo, "almacenamiento" y transmisión de la resistencia suponen tanto plásmidos como elementos de transposición, son el sustrato desde el que se puede concebir el crecimiento vertiginoso del número de enzimas que inactivan los ABL. El diseño de nuevos antibióticos no se ha detenido desde la década de los años 60; la caracterización de nuevas *Bla*s tampoco. Aunque parece difícil establecer una frontera entre viejos y nuevos ABL y entre antiguas y nuevas *Bla*s, toda vez que el proceso no ha tenido discontinuidad, a efectos prácticos nos atrevemos a hacer una diferenciación coincidente con el empleo clínico de los nuevos ABL y la aparición de *Bla*s con un espectro hidrolítico enormemente extendido. En este sentido, siguiendo la clasificación de Bush de 1989, llamaremos *Bla*s plasmídicas clásicas (BPC) a aquellas que conforman los subgrupos 2b, de amplio espectro; 2c, carbenicilinasas; y 2d, oxacilinasas, y nuevas *Bla*s plasmídicas de espectro ampliado (BPEA): aminotiazol-oxiimino *Bla*s, cefamicinasas y carbapenemasa, a las que integran el grupo 2b' de dicha clasificación y han sido caracterizadas a partir de 1983.

6.6.1 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS CLASICAS.

6.6.1.1 BETALACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO.

Grupo de enzimas identificado de forma progresiva a raíz del empleo clínico de penicilinas semisintéticas y cefalosporinas de 1ª generación en la segunda mitad de los años 60. Clasificadas como Clase IIIa por Richmond y Sykes en 1973, pasan a ser denominadas Blas de amplio espectro en la clasificación propuesta por Matthew et al. en 1979. En la actualidad conforman el grupo 2b de la clasificación de Bush e incluyen 10 enzimas de pI comprendido entre 5.2 y 8.1, cuyas características más relevantes están resumidas en las tablas 3 y 7. Son Blas que muestran una tasa de hidrólisis similar para penicilina y cefaloridina, inhibidas por el a. clavulánico y en ocasiones también por la cloxacilina, cuya nomenclatura tiene raíces variables alusivas a las más variadas circunstancias^{216,262}.

Algunas de estas Blas: TEM-1, TEM-2 y SHV-1, son especificadas por transposones, y están extraordinariamente difundidas entre la población microbiana, mientras que otras corresponden a "aislamientos aislados". La homología o similitud entre las Blas de este grupo se ha puesto de relieve por técnicas inmunológicas y por hibridación con sondas ADN. La secuenciación de nucleótidos ha demostrado la breve diferencia, un aminoácido, entre TEM-1 y TEM-2^{201,282}. Además de su repercusión clínica "per se", son enzimas de enorme interés toda vez que mutaciones puntuales que afectan a algunos de sus pares de bases, han dado lugar a nuevas Blas con características distintas y espectro muy ampliado.

TEM-1 es la Bla representativa del grupo^{198,259,262}. Está muy difundida entre las bacterias patógenas y es, cuantitativamente, la mayor responsable de la resistencia a ABL entre los microorganismos de procedencia clínica. Su denominación es tomada de las iniciales "Temoniera" del primer paciente del que se aisló la cepa inicial. Posee un pI de 5.4 e hidroliza de manera equivalente a ampicilina y cefaloridina, y en menor grado a la carbenicilina. El fenotipo de resistencia que confiere se caracteriza por la resistencia a penicilinas semisintéticas y en ocasiones a algunas cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, en función del nivel de producción. Su sensibilidad a la inhibi-

ción por a. clavulánico, sulbactam y tazobactam, se ve reflejada en las pruebas de sensibilidad, aunque la producción incrementada de enzima puede conferir valores de CMI incluidos en el rango de los tomados como resistentes. La homología inmunológica y genética entre TEM-1 y otras β las del grupo se ha demostrado fehacientemente. Antisero TEM-1 reacciona con TEM-2 y TLE-1 e inactiva parcialmente SHV-1, pero no con oxacilinasas o carbenicilinasas²⁸⁶. La homología genética con TEM-2, TLE-1 e incluso OXA-2 se ha evidenciado por hibridación con sondas ADN-241,243,287,288. El origen genético común de TEM-1 y otras enzimas del grupo se ha sugerido ante la similitud en la secuencia de aminoácidos de las distintas proteínas^{201,216,285}.

TEM-1 es, sin duda, la β la más difundida entre los microorganismos con posibilidades de causar patología infecciosa, y constituye el mejor exponente de diseminación de la resistencia, tanto "per se" como por las alternativas que ha abierto a través de la mutación genética. Inicialmente caracterizada en *Salmonella* y *E. coli*^{198,203} y después en el resto de las *Enterobacteriaceae*, TEM-1 ha sido posteriormente encontrada en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Vibrio*. Está considerada como la β la más prevalente y la que por mutación ha originado mayor número de β las plasmídicas de espectro muy ampliado. TEM-1, asimismo, posee el privilegio de ser el mecanismo de resistencia que más ha contribuido al desarrollo de la quimioterapia antimicrobiana.

TEM-2 es un enzima muy similar a TEM-1 en muchas de sus características^{216,259,262}. Difiere en el pI, 5.6, en su mayor eficiencia hidrolítica, en uno de los aminoácidos, lisina por glicina, de su secuencia, y fundamentalmente en que es mucho menos prevalente que TEM-1 entre las bacterias patógenas, aunque se ha caracterizado en la mayoría exceptuando *Morganella*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Vibrio*. También a expensas de TEM-2 y por mutación se han desarrollado varias de las nuevas β las plasmídicas de espectro muy ampliado.

SHV-1, enzima prevalente en *K. pneumoniae*, debe su nomenclatura al grupo sulfidril-variable característico de su molécula^{259,262}. Es una β la con aspectos peculiares derivados de su control genético dual, ya que es codificada por determinantes localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos y en un transpo-

són de 14,3 kb²⁸⁹. SHV-1 muestra extensa homología genética con TEM-1 que revela un probable origen común o relacionado. Datta a finales de los años 60 esboza la hipótesis recogida por Medeiros como comunicación personal, sugiriendo que TEM-1 puede derivarse de la "βla cromosómica SHV-1"²⁶². El fenotipo de resistencia que confiere está, obviamente, muy relacionado con su perfil hidrolítico de mayor eficiencia para ampicilina que para carbenicilina y cefalosporinas. En *K. pneumoniae*, SHV-1 otorga resistencia específica a ampicilina y en menor grado a carbenicilina, mientras que la actividad de las cefalosporinas de 1ª generación está mediatizada por el nivel de producción enzimática. Aunque es un enzima muy frecuente en *Klebsiella*, también ha sido identificada en *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *Proteus* indol (+), y no en *Enterobacteriaceae* con βlas inducibles, ni en *Shigella*, *Haemophilus* y *Neisseria*. Como TEM-1 y TEM-2, SHV-1 ha dado lugar a nuevas BPEA SHV, que hidrolizan los nuevos AβL.

Las restantes βlas plasmídicas de amplio espectro se han encontrado de forma prácticamente "simbólica" en un escaso número de bacterias por lo que su repercusión clínica es muy limitada. HMS-1, una βla de pI 5.2 descrita en 1979 por Matthew, Smith y Hedges de cuyas iniciales adquiere el nombre²⁵⁹, solamente se ha reconocido en un aislamiento de *P. mirabilis*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, respectivamente. TLE-1, es una enzima caracterizada en exclusiva en *E. coli*, con pI, peso molecular, perfil de sustrato y homología genética coincidentes o muy próximas a TEM-1^{261,290}. LXA-1, es un βla también "esporádica", con baja afinidad por penicilina para ser plasmídica, que confiere niveles muy bajos de resistencia a AβL por lo que su presencia puede llegar a no ser advertida. Se ha identificado en cepas clínicas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* y *C. freundii* ²⁹¹.

ROB-1, muestra una acumulación catódica en el IEE que sugiere una fuerte unión a la membrana o bien naturaleza lipoproteica ²⁶². Alguna de sus propiedades semejan a TEM-1 aunque muestra mayor tasa de hidrólisis para la ampicilina y menor de cefaloridina. Fué reconocida inicialmente en una cepa de *H. influenzae* tipo b aislada de un paciente con meningitis²⁹² y posteriormente se ha encontrado en otras dos cepas en USA²⁹³ y Francia²⁹⁴. Curiosamente, ROB-1 se ha identificado en *H. pleuropneumoniae* y *P. multocida* de origen porcino²⁹³.

LCR-1 y NPS-1, son *β*las obtenidas en aislamientos de *P. aeruginosa* aunque de origen diferente. LCR-1 se halló en una cepa resistente a carbenicilina aislada de un paciente quemado²⁹⁵. Tiene el pI más básico entre todas las *β*las de amplio espectro y un elevado PM que sugiere un dímero. Es codificada por un plásmido de grupo de incompatibilidad P2 y por el transposón 1412 que porta, también, marcadores de resistencia a aminoglicósidos²⁹⁶. NPS-1 se ha identificado en dos cepas de *P. aeruginosa* con alto nivel de resistencia a carbenicilina²⁹⁷. Muestra mayor tasa de hidrólisis de oxacilina que otras *β*las plasmídicas de amplio espectro y su actividad se ve afectada reversiblemente por la cefsulodina, probablemente por cambios estructurales en su conformación que alteran su actividad catalítica.

Finalmente, OHIO-1, es una *β*la localizada exclusivamente en el estado de EE.UU que le confiere el nombre. Por razones todavía por esclarecer, constituye un excelente modelo del gen *β*la endémico que afecta a una sola zona o región. Inicialmente se reconoció en una cepa de *E. cloacae* aislada de una muestra ambiental; después fue identificada en 31 bacilos gram-negativos que comprenden 10 especies de *Enterobacteriaceae* obtenidas en dos hospitales de Ohio. Por el momento no se ha encontrado en otros microorganismos²⁹⁵.

6.6.1.2 OXACILINASAS.

Estas enzimas que hidrolizan oxacilina, cloxacilina y meticilina, fueron incluidas por Richmond y Sykes en la Clase V, e integran en la actualidad el grupo 2d de la clasificación de Bush. Son *β*las de amplio espectro, de pI oscilante entre 6.9 y 7.7, que hidrolizan también ampicilina, carbenicilina y cefaloridina y muestran un perfil de inhibición casi restringido a pCMB (Tabla 7). El fenotipo de sensibilidad no las separa en exceso de las *β*las tipo TEM, aunque alguna hidroliza debilmente algunos ABL de 3ª generación, por lo que un nivel alto de producción del enzima supondrá "pérdida de sensibilidad" para cefotaxima, y ceftazidima²⁶². Las oxacilinasas muestran cierto grado de homología entre ellas; para OXA-1 y 4 se ha demostrado reactividad inmunológica cruzada por medio de antisueros recíprocos^{298,299}, mientras que tal hecho es más incierto entre OXA-2 y 3²¹⁶. La homología genética se ha puesto de relieve por

hibridación entre una sonda OXA-1 y ADN del gen OXA-2²⁹⁸ y en la comparación de la secuencia de nucleótidos de las mismas *β*las^{260,300}. Entre ambas se ha comprobado un grado de homología superior al 48%, que no se alcanza con otras *β*las de las clases A, B ó C. Esta disonancia ha llevado a proponer la creación de una nueva clase molecular D en la que se ubicarían OXA-1 y OXA-2.

Las *β*las OXA-1, 2, 3, 4 y 5 son codificadas por elementos de transposición de tamaño molecular que varía entre 14,6 y 20 Kb²¹⁶. En concordancia con ello, OXA-1, OXA-2 y OXA-3 son relativamente frecuentes en **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa**, mientras que las nuevas oxacilinasas descritas en 1985 se han identificado de manera muy esporádica³⁰⁰. En relación con ello, la repercusión terapéutica de estas enzimas es mayor para OXA-1 y OXA-2, pero en ningún caso alcanzan el nivel de TEM-1. Aunque OXA-1 es la segunda *β*la en orden de prevalencia en gram-negativos, resulta algo sorprendente que no se hayan identificado, por el momento, nuevas *β*las plasmídicas de espectro extendido de tipo OXA.

OXA-1 es el enzima de mayor interés en el grupo. Se diferencia del resto por su mayor tasa de hidrólisis de meticilina en relación con oxacilina, así como por su más efectiva actividad hidrolítica respecto de cefotaxima^{259,262}. Codificada por el transposón Tn2603³⁰¹, se ha encontrado con un índice de prevalencia que oscila entre 6 y 9% para **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa** respectivamente²⁶². Aunque parece un enzima "casi específico" de cepas de **Salmonella** resistentes a ampicilina aisladas en algunos lugares de Europa y Africa, lo cierto es que también se ha reconocido como causa de resistencia a ampicilina en casi todas las **Enterobacteriaceae** y con mayor profusión en **E. coli**.

OXA-2 y OXA-3 son dímeros de PM elevado y cierta homología a nivel genético puesta de relieve tanto por hibridación como por la secuencia de nucleótidos^{259,290,300}. Ambas son codificadas por los transposones Tn2410, para OXA-2, y Tn1411 para OXA-3, que además contiene el determinante de resistencia a gentamicina²⁹⁶. OXA-3 está menos difundida entre los microorganismos gram-negativos y ha sido caracterizada en **E. coli**, **Klebsiella**, **Providencia** y **P. aeruginosa**. OXA-2 tiene mayor repercusión en

la resistencia clínica, en particular respecto a *Salmonella* y *Pseudomonas* aunque también está especificada por aislados clínicos de *E. coli*, *P. mirabilis* y *Serratia*²⁶².

Las nuevas oxacilinasas OXA-4, 5, 6 y 7 fueron descritas por Medeiros et al. en 1985²⁹⁰. Tienen pl¹ próximos, particularmente las tres últimas, que varían entre 7.45 y 7.68 y un perfil hidrolítico algo distinto ya que OXA-4 ofrece mayor tasa de hidrólisis para meticilina, OXA-5 para cloxacilina y OXA-6 y 7 para oxacilina. Todas ellas inactivan en cierto grado la cefotaxima, y OXA-4 y 5 el moxalactam²⁶². Aunque OXA-4 es codificada por el transposón Tn 1409²⁹⁶, ninguna de estas oxacilinasas son relevantes desde la perspectiva de la resistencia a ABL, dado que OXA-4 y 7 solamente han sido identificadas en sendas cepas de *E. coli* y OXA-5 y 6 en *P. aeruginosa*.

6.6.1.3 CARBENICILINASAS.

Conocidas como "carbenicilinasas" por su alta tasa de hidrólisis de carbenicilina, o *Blas* de *P. aeruginosa* por su adscripción inicial y exclusiva a este especie, fueron incluidas en la Clase V de Richmond y Sykes junto con otras *Blas* plasmídicas. Si la primera designación se adecúa a la superior tasa de hidrólisis de carbenicilina en relación con ampicilina, muy por encima de la registrada para otras *Blas*, la segunda es poco afortunada debido a que estas enzimas han sido identificadas, además, en otros microorganismos^{202,259}. En la clasificación más actualizada de Bush de 1989, integran el grupo 2c como *Blas* que hidrolizan preferentemente penicilinas y más eficazmente carbenicilina, y son inhibidas por el a. clavulánico. Sus propiedades fisico-químicas y bioquímicas, y su distribución bacteriana estan resumidas en las Tablas 3 y 7. Muestran pl¹s que oscilan entre 4.3 y 6.83, dos de ellas, PSE-1 y PSE-2, hidrolizan significativamente la cefotaxima³⁰², y cuatro, PSE-1, PSE-2, PSE-4 y CARB-3, son codificadas por elementos de transposición²¹⁶. Los estudios inmunológicos evidencian una cerrada relación entre PSE-1, PSE-4 y CARB-3 y entre N-3 y N-29. La hibridación ADN-ADN también revela un alto grado de homología genética entre PSE-1, PSE-4 y CARB-3.

El grupo está formado por 11 enzimas, identificadas en *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, otros BGNNF y *Moraxella* (*Branhamella*-

la). Cronológicamente, las 4 β las PSE se pueden considerar más clásicas en contraposición de las restantes, descritas en su mayoría en los pasados 10 años. PSE-2 y BRO-1 podrían ser consideradas más oxacilinasas que carbenicilinasas por la mayor tasa de hidrólisis de oxacilina y meticilina. La elevada homología entre las secuencias de nucleótidos de PSE-2 y OXA-2 también contribuye a hacer más sólida la propuesta de incluir esta β la en el grupo 2d²²⁰. Con la excepción de PSE-1, frecuente en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbenicilina, y BRO-1, habitual en *M. catarrhalis*, el resto son bastante infrecuentes entre la población patógena y algunas francamente raras. Su repercusión clínica, por tanto, es variable y relacionada con su prevalencia. Por otra parte, tampoco se han descrito nuevas β las plasmídicas de espectro ampliado a expensas de estas carbenicilinasas.

PSE-1 es la β la más importante del grupo e idéntica a la β la CARB-2 descrita por Labia et al^{303,304}. Enzima de mayor prevalencia en *P. aeruginosa*, es producida por más del 50% de las cepas que muestran resistencia plasmídica a carbenicilina²¹⁶. También ha sido identificada en aislados clínicos de *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *Shigella*³⁰⁵⁻³⁰⁷. La síntesis por otras especies que *P. aeruginosa* puede estar relacionada con la codificación por los transposones Tn1401 y Tn1403³⁰⁷. PSE-1 confiere cierto grado de resistencia a cefotaxima, superior al inherente al microorganismo "per se", y ha hecho patente su homología con otras enzimas del grupo al mostrar hibridación entre una sonda PSE-1 y genes β la de PSE-4 y CAR-3²⁴⁴.

PSE-2 es una β la atípica dentro del grupo. Tiene una alta capacidad hidrolítica para meticilina, oxacilina y cloxacilina, y es inhibida por ClNa, pCMB y no por cloxacilina. También hidroliza, aunque en menor grado, cefotaxima y moxalactam³⁰². Su secuencia de nucleótidos, determinada en 1988, muestra significativa homología con OXA-2 y no con ninguna de las enzimas del grupo PSE. Inicialmente se le consideró específica de *P. aeruginosa*, aunque estudios posteriores desvelaron que tiene la tasa más baja de incidencia entre las enzimas PSE²¹⁶. PSE-2 se ha caracterizado también en *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus indol* (+) y *Providencia* ^{216,307}.

PSE-3 es la enzima con mayor tasa de hidrólisis de carbenicili-

na²⁰³. Mediada por el transposón Tn1404, que también contiene genes de resistencia a gentamicina³⁰⁸, se puede considerar un enzima "casi específico" de *P. aeruginosa* aunque su prevalencia no supera el 2% de las cepas resistentes a carbenicilina. En un estudio realizado en nuestro país por Roy et al., PSE-3 fué caracterizada también en *Klebsiella*³⁰⁹.

Las diferentes líneas de investigación seguidas por distintos grupos de trabajo, concluyeron con el hallazgo de nuevas enzimas en *P. aeruginosa* con propiedades coincidentes y nomenclatura dispar. Algunas de las Blas conocidas como PSE en la literatura inglesa son idénticas a enzimas designadas como CARB por el grupo de Labia³⁰⁴. PSE-1 es análoga a CARB-2; PSE-4, también identificada como CARB-1, es una de las Blas más frecuentes en *P. aeruginosa*, y ha sido encontrada exclusivamente en este microorganismo²⁰³. Determinada por los transposones Tn2521 y Tn1405²⁹⁶, esta Bla muestra un elevado grado de identidad genética con CARB-3 y PSE-1^{241, 244}. CARB-3 y CARB-4 no tienen enzima equiparable en la serie PSE, pero sí ciertas características próximas. Ambas son Blas muy infrecuentes y monopolio de *P. aeruginosa*. CARB-3 determinada por el transposón Tn1408 tiene gran similitud con PSE-1 y 4^{296, 304}. CARB-4, descrita en 1986, muestra un pI de 4.3 inusualmente bajo y conlleva resistencia a la cefsulodina a pesar de no haberse podido demostrar actividad hidrolítica sobre ese sustrato³¹⁰.

En el transcurrir de los últimos 10 años, se han caracterizado otras Blas con perfil de carbenicilinasas en otros microorganismos diferentes de *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*. AER-1 es una Bla descrita en 1985 en una cepa de *A. hydrophila*³¹¹. SAR-1 es una enzima peculiar identificada en una cepa de *V. cholerae* biotipo El Thor, con perfil de sustrato diferente de PSE-1 y CARB-4 y perfil de inhibición más coincidente con el de TEM-1³¹². BRO-1 es la Bla más común en *M. catarrhalis* responsable del efecto inóculo detectado respecto a ampicilina y cefaclor³¹³. Finalmente existen dos enzimas, todavía sin nombrar, obtenidas de las cepas de *P. mirabilis* N-3 y N-29 con características que permiten su inclusión en este grupo³¹³.

TABLA 7.- CARACTERISTICAS DE LAS BETALACTAMASAS PLASMIDICAS CLASICAS.

Betalactamasa	pI	Tasa relat.hidrolisis*				P.Inhibición			P. mol
		AMP	CAB	OXA	CFD	CLX	PMB	CLV	
<u>Amplio espectro</u>									
TEM-1	5.4	72	12	4	60	+	-	+	22.000
TEM-2	5.6	107	10	5	74	+		+	23.500
SHV-1	7.6	212	8	0	56	+	±		21.000
HMS-1	5.2	253	14	2	183	+	+		21.000
TLE-1	5.55	67	13	4	52	+		+	19.800
TLE-2	6.5								
LCR-1	5.85	145	4		55	+	-	+	44.000
OHIO-1	7.0	140	11	.5	79	+		+	22.000
NPS-1	6.5	223	18	40	3	-	-		25.000
LXA-1	6.7								
ROB-1	8.1	107	19		37	+	-	+	
<u>Oxacilinasas</u>									
OXA-1	7.4	419	65	271	112	-	±	-	23.000
OXA-2	7.7	236	27	581	108	-	-	-	43.900
OXA-3	7.1	178	10	336	44	-	-		41.200
OXA-4	7.45	325	57	188	110	-		-	23.000
OXA-5	7.62	188	40	210	89	-		-	27.000
OXA-6	7.68	596	46	1048	149	+		-	40.000
OXA-7	7.65	545	48	702	136	-		-	25.300
SN (GN11499)	6.9	357	43		71		±	+	41.500
<u>Carbenicilinasas</u>									
PSE-1 (CARB-2)	5.7	84	100	9	27	-	+		28.500
PSE-2	6.1	173	87	273	50	-	+		12.400
PSE-3	6.9	101	253		10		-		12.000
PSE-4 (CARB-1)	5.3	88	150	8	40	-	-		32.000
CARB-3	5.75	100	147	12.5	44				31.000
CARB-4	4.3	130	79	1	15	-	+	+	22.000
AER-1	5.9	38	98	0.9	26				22.000
SAR-1	4.9	63	122		21	+	-	+	33.700
BRO-1	5.6	103	78		23				
SN (N-3)	6.0	113	113		12				24.000
SN (N-29)	6.9	124	128		6				22.000
<u>Cefalosporinasas</u>									
CEP-1	8.0								37.500
CEP-2	8.1		48		108				36.200

* Penicilina G = 100. ** Datos tomados de las referencias 216, 262.

6.6.1.4 CEFALOSPORINASAS.

Las β las plasmídicas además de ser constitutivas, ofrecen casi como una característica definitoria, un perfil de sustrato amplio con actividad hidrolítica sobre penicilinas y cefalosporinas. Por eso el hallazgo de β las codificadas por plásmidos con un perfil cefalosporinasa, no deja de ser "una nota de color" en un mundo excesivamente uniforme. Bobrowski et al. describen en 1976 una β la, CEP-1, obtenida en *P. mirabilis*, con características que la asemejan a la β la cromosómica AmpC de *E. coli*³¹⁴. Posteriormente, Levesque et al. en 1982, detallan las propiedades de otra cefalosporinasa plasmídica de *Achromobacter*, CEP-2, que difiere de CEP-1 en su habilidad para hidrolizar la carbenicilina y en la resistencia a la inhibición por cloxacilina³¹⁵. Ambas β las se consideran de "aislamientos aislados" y no tienen mayor trascendencia clínica.

6.6.2 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS CLASICAS: RESISTENCIA Y REPERCUSION CLINICA.

Los aspectos particulares de cada β la relativos a sus características fisico-químicas, bioquímicas, e incluso su distribución entre la flora patógena, considerados de forma no relacionada, no tendrían mucho sino cristalizasen de forma conjunta en un crisol donde se pudiera escudriñar en profundidad sus implicaciones en la resistencia a ABL. Es este un interesante epígrafe que globaliza, en cuanto a repercusión terapéutica, los aspectos generales y concretos de cada enzima y su interrelación con cada uno de los ABL.

Existen varias formas de enfocar y analizar el problema. De una parte están los parámetros enzimáticos de cada β la, que contribuyen a llevar adelante la reacción hidrolítica y que variando, de una enzima a otra y de un ABL a otro, siguen un modelo parecido para todas las diferentes β las. En segundo término la estructura bacteriana y la fisiología desigual de las distintas enzimas contribuye a crear modelos de actuación, o "modelos hidrolíticos", diferentes para β las de gram-positivos y gram-negativos. Finalmente, para aproximarnos al verdadero alcance clínico-terapéutico del problema es necesario analizar la epidemiología de cada β la y cada microorganismo, la prevalencia de cada enzima en cada grupo de bacterias, las limitaciones tera-

péuticas implícitas a cada β la y, probablemente, la patología infecciosa adscrita a cada microorganismo.

La competencia establecida entre un ABL y una β la se inclinará de uno u otro lado en función de la preponderancia y eficacia de los distintos parámetros puestos en juego por antibiótico y microorganismo. En teoría, para que un ABL sea eficiente precisa de una farmacocinética propicia que contribuya a mantener concentraciones en fluidos y tejidos superiores a las necesarias para inhibir el desarrollo del microorganismo. En segundo término, su tamaño molecular debe ser inferior a 700 daltons para facilitar la penetración en el interior de la bacteria. Además debe gozar de elevada resistencia a β las y alta afinidad por las PBPs esenciales para cada microorganismo. En la medida que cuantitativamente estos parámetros sean más positivos, mayores probabilidades de inclinar la balanza biológica a su favor.

En el otro extremo de la contienda, son varios los parámetros que contribuyen al nivel de resistencia mediado por una β la. La eficiencia de una enzima en hidrolizar un ABL depende de la tasa de hidrólisis (V_{max}) expresada con relación a la de la penicilina o cefaloridina, y de la afinidad por el ABL (K_m), valor difícil de obtener con substratos que son hidrolizados débilmente. Además, el nivel de producción del enzima interviene decisivamente y puede variar con la fase del crecimiento celular que se considere o incluso con las condiciones de incubación. En β las cromosómicas la producción enzimática puede incrementarse por mutación genética o por inducción. En β las plasmídicas, el nivel de producción puede modificarse en función del número de genes por plásmido que codifiquen el enzima o por el número de copias del plásmido por célula. Existe amplia documentación bibliográfica que revela que la actividad de TEM-1 en *E. coli* varía entre márgenes superiores a 100 veces, determinando resistencia clínica a diferentes ABL³¹⁶⁻³¹⁸. Jacoby y Sutton demuestran que niveles incrementados de distintas β las plasmídicas en transconjugantes de *E. coli* C600 se relacionan directamente con el incremento de los valores de CMI³¹⁹. En el trabajo experimental desarrollado en esta tesis doctoral, también demostramos que la producción incrementada de TEM-1 y OXA-1 se asocia con distintos niveles de resistencia a ABL, variables y diferentes en función de cada uno de los antimicrobianos.

En el interior de la célula bacteriana, cada β la contribuye a la resistencia mediante "modelos hidrolíticos" diferentes²¹⁶. Las características de extracelularidad de las β las en **Staphylococcus** generan un modelo bien delimitado. Sin duda es el más sencillo en cuanto a su "modus operandi", ya que el enzima sale con facilidad del interior de la bacteria al encuentro con el ABL. En una primera fase, existe lisis bacteriana por la acción del antibiótico e inmediatamente se produce su destrucción por la acción del enzima. El resultado final de "la disputa" depende de la existencia de bacterias viables, una vez que la concentración de antimicrobiano desciende por debajo de la CMI. En tal caso, tiene lugar el sobrecrecimiento y la población bacteriana se considera resistente. El grado de resistencia es bajo a nivel de cada célula, requiriendo la cooperación de muchas para alcanzar valores significativos²⁰⁹.

Un modelo hidrolítico con cinética muy similar, ocurre en gram-negativos, **Haemophilus** y **Neisseria** productoras de TEM-1 de localización periplásmica, no extracelular, que no poseen una barrera externa consistente³²⁰. Tanto en estos microorganismos como en **Staphylococcus** el efecto inóculo es importante y los valores de CMI varían ampliamente en función de las UFC utilizadas como inóculo bacteriano. El nivel de resistencia de cada célula individualizada es muy bajo, y puede determinar la curación clínica, ocasional, de infecciones por alguno de estos microorganismos, tras el tratamiento con dosis altas de ABL sensibles a la hidrólisis enzimática. En el otro extremo del problema, se han aislado cepas de **H. influenzae** y **N. gonorrhoeae** con elevado nivel de resistencia, como consecuencia de mutaciones en el promotor de β la que ocasionan una expresión más efectiva del enzima²⁸⁵.

El modelo más usual en gram-negativos y también el más complejo, es el protagonizado por **E. coli** resistente a penicilinas por producción de TEM-1²¹⁶. A él obedecerían el resto de las β las plasmídicas de gram-negativos independientemente de su espectro de hidrólisis. En este caso la barrera de penetración al antibiótico es significativa y el enzima, localizado estratégicamente en el espacio periplásmico, tiene la posibilidad de destruir al antibiótico a medida que este penetra en el interior de la célula. En este modelo se dan niveles elevados de resistencia considerando células individuales, aún cuando su

expresión en valores de CMI depende, además del grado de producción del enzima, del nivel de ABL alcanzado en el espacio periplásmico y de la afinidad del restante antibiótico no inactivado por las PBPs esenciales en cada microorganismo^{209,321}. Un buen ejemplo de las fluctuaciones inherentes a este modelo lo constituyen los niveles de resistencia conferidos por *Bla* tipo TEM frente a las diversos grupos de cefalosporinas, incluyendo las de 3ª generación. La estructura de la ME en *Serratia* y *Pseudomonas* proporciona una variante añadida de un modelo bastante análogo para *Enterobacteriaceae* y BGGNF.

Las *Bla* plasmídicas son constitutivas, tienen amplia distribución en gram-negativos y su diseminación epidémica es un fenómeno real, garantizado por la presencia de genes *Bla* en plásmidos y transposones que aseguran la inexistencia de exclusividad enzimática en cada especie. En paralelo la presión selectiva que genera el uso amplísimo de ABL favorece la selección de cepas resistentes, prevalentes en principio en un pequeño ámbito y dominantes después en nichos ecológicos mucho más amplios. La envergadura de la diseminación, el desarrollo de brotes epidémicos, o la institución de situaciones con carácter endémico en zonas restringidas o más amplias están subordinados a muchos factores, entre ellos: las características de tamaño y transponibilidad de los transposones, el rango de huéspedes y la transferibilidad de los plásmidos, la epidemiología de la bacteria que las alberga e incluso el consumo de antimicrobianos.

El éxito de TEM-1 como vehículo de resistencia a ABL se sustenta en la yuxtaposición de todas las características anteriores expresadas en grado superlativo. Es una *Bla* codificada por diversos transposones, alguno de ellos de tamaño pequeño y elevada capacidad de transposición, que pueden intercambiarse en muchas combinaciones con un elevado número de plásmidos pertenecientes a 18 grupos de incompatibilidad. De origen desconocido, aunque posiblemente derivada de una *Bla* cromosómica, está presente en toda la gama de gram-negativos con posibilidades de causar patología. Son, por tanto, estos atributos los que confieren a TEM-1 su notoriedad entre todas las *BPC*, más incluso que su perfil hidrolítico del que se diferencia poco respecto a las demás enzimas del grupo.

Con escasos matices diferenciales, todas las *Bla* plasmídicas

hidrolizan las penicilinas semisintéticas, confiriendo resistencia clínica en grado diverso, pero resistencia que suele invalidar su empleo, a ampicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. La presencia del grupo metoxi en C₆ confiere resistencia a temocilina, aún al precio de disminuir su actividad intrínseca. La posibilidad e hidrólisis de la mayoría de las cefalosporinas de 1ª generación y alguna de las de 2ª, cefamandol, cefaclor y en cierta forma cefuroxima, no se corresponde con los valores de CMI que permiten hablar de sensibilidad o resistencia en términos farmacocinéticos y clínicos. Sin duda influyen varios factores que alteran la relación ABL-βla en el espacio periplásmico, toda vez que la producción incrementada de enzima evidencia sin duda la resistencia.

El problema de interpretación y por ende de decisión terapéutica, se plantea con aquellas cepas que muestran valores intermedios de CMI que sin duda denotan la presencia de un mecanismo de resistencia probablemente eficaz. Es este un problema menor al considerar la efectividad de los nuevos ABL diseñados para eludir la resistencia por estas βlas. Aún cuando con técnicas de bioensayo, que emplean bajas concentraciones de sustrato y elevadas de enzima, se detecta la hidrólisis de buena parte de estos antimicrobianos por enzimas de tipo TEM, OXA y PSE, la contribución de las BPC a la resistencia a ABL de 3ª generación no parece importante, y precisa de un incremento significativo de la producción de enzima y de la cooperación de alteraciones en la permeabilidad celular.

Completar el panorama de la resistencia mediada por BPA, requiere el análisis de la distribución de las diferentes enzimas en los patógenos más habituales; con ello podemos tener una idea muy aproximada de la magnitud del fenómeno. A este respecto, son muchos los estudios, de mayor o menor amplitud, elaborados a lo largo de los cinco continentes, de los que colegir las βlas diferentes caracterizadas en cada especie, la incidencia cuantitativa de cada βla entre las cepas resistentes, y la variabilidad geográfica que, no obstante, respeta ciertos patrones de distribución^{203,262,306,309,318,322-329}. El mayor número de enzimas diferentes se ha identificado en *P.aeruginosa* (16 βlas), contrastando con la incidencia baja de cepas de esta especie resistentes a la carbenicilina o que al menos deben su

resistencia a este mecanismo. En orden decreciente le siguen especies que carecen de otros mecanismos relevantes de resistencia: *E. coli* (12), *Klebsiella* (10), *P. mirabilis* (9), *Salmonella* y *Providencia* (6). No parece casual que aquellas especies bien dotadas para la resistencia por medio de las cromosómicas inducibles, sintetizen un número inferior de las plasmídicas distintas. De nuevo, se pone de manifiesto "la economía bacteriana de la resistencia", un concepto digno de la más amplia reflexión.

En *E. coli* se han identificado 12 BPC diferentes. Por el momento no se han encontrado HMS-1, OXA-5 y OXA-6, PSE-3 y PSE-4, y CARB-3 y CAR-4 así como alguna de las específicas de otros microorganismos. Obviamente, la más común es TEM-1 a la que se debe la mayor parte de la resistencia a ampicilina. Su incidencia fluctúa en los diversos estudios entre 49% y 96% con una media de 77%. Estos datos están en manifiesta contraposición con los obtenidos para TEM-2, ausente en *E. coli* en muchos de los estudios, y con incidencia inferior al 2% en los que sí se ha caracterizado. OXA-1 es la segunda BPC más frecuente en *E. coli*, con una incidencia que oscila entre 2% y 16% y un valor medio del 6% considerando los diversos trabajos. La presencia de SHV-1 es reconocida en pocos estudios aunque tiene una incidencia media del 4% en los positivos. No es infrecuente el hallazgo de dos y hasta tres BPC distintas en *E. coli*, siempre TEM-1 asociada generalmente a OXA-1, SHV-1 y PSE-1²⁶².

La situación en *P. mirabilis* no parece diferir mucho de la comentada en *E. coli*, aunque en algún estudio aparece TEM-2 con mayor frecuencia que TEM-1²¹⁶. Se han encontrado 9 BPC entre las que se incluyen CEP-1 y las de las cepas N-3 y N-29, y no se han caracterizado OXA-3, OXA-4, OXA-5, OXA-6 y OXA-7 ni PSE-2, PSE-3 y PSE-4. La resistencia a ampicilina en *Salmonella* y *Shigella*, se ha ido acrecentando paulatinamente en muchos países como consecuencia, verosimilmente, de la diseminación por plásmidos y transposones. En *Salmonella*, se han caracterizado 6 BPC diferentes: TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1, OXA-2 y PSE-1. Aunque su distribución varía en las diversas áreas geográficas, TEM-1 es la más común con cifras de incidencia superiores al 85% de las cepas resistentes. OXA-2, una BPC de escasa relevancia en *E. coli* es más usual en *Salmonella* alcanzando una incidencia próxima al 15%. La coincidencia en la producción de TEM-

1 por cepas de origen humano y animal pone de manifiesto la circulación de genes entre aislamientos de distinta procedencia²⁶². En *Shigella* las cifras de resistencia a ampicilina son superiores hasta convertirse, en algún medio, en un marcador fenotípico. Se han caracterizado 3 enzimas: TEM-1, TEM-2 y PSE-1, debiéndose la resistencia fundamentalmente a la primera.

En *K. pneumoniae* se han llegado a reconocer 10 BPC distintas, predominando SHV-1 y TEM-1^{216,261,262}. Entre 61% y 94% de las cepas incluidas en todos los estudios producen SHV-1, mientras que el rango de valores para TEM-1 oscila entre 10% y 46%. Por el momento no se han identificado OXA-2, OXA-4, OXA-5 ni PSE-1 y PSE-4. En otras especies de *Klebsiella* también se han encontrado diversas BPC aunque con menor incidencia. En *K. oxytoca* se han caracterizado 3 las similares, mientras que en *K. ozenae* al parecer sólo se ha demostrado la presencia de TEM-1^{216,261}.

La resistencia por 3 las cromosómicas inducibles, que veremos con más extensión en un próximo apartado, dota a las bacterias que genéticamente la codifican y la expresan de un arma muy eficaz en el propósito de contrarrestar la acción de los ABL. En el grupo amplio de *Enterobacteriaceae* que disponen de este mecanismo se han caracterizado muchas menos BPC, la resistencia a penicilinas semisintéticas es más baja, y cuando ocurre parece debida a TEM-1. En *Enterobacter* y *Citrobacter* la incidencia de resistencia por BPC es muy variable. En ambas especies se han identificado 6 y 5 enzimas respectivamente siendo comunes: TEM-1 y TEM-2, LXA-1 y OHIO-1^{216,262}. *Morganella* y *Serratia* codifican 4 BPC: SHV-1 y OXA-1 en el primer caso, y TEM-2 y OXA-2 en el segundo, marcan las diferencias. OHIO-1 y TEM-1 son comunes a ambas especies, y mientras la primera muestra una difusión muy localizada, TEM-1 alcanza la mayor incidencia entre estos cuatro géneros^{216,261}.

La situación cambia al considerar la resistencia a ABL en *P. aeruginosa*. Se han caracterizado 16 BPC bien diferenciadas que confieren resistencia a carbenicilina y al resto de penicilinas semisintéticas, no obstante las posibilidades de diseminación parecen bastante restringidas ya que la resistencia mediada por estos enzimas no supera en general el 15%. Medeiros²¹⁶ resume los datos ofrecidos por cuatro estudios de incidencia distintos, dos realizados en Francia^{322,326}, y otros dos en el Reino

Unido³²⁹ y España³²⁷ respectivamente. PSE-1 (53% de incidencia) es la BPC más usual, mientras que el resto, con incidencia notablemente inferior, sigue el siguiente orden decreciente: OXA-2 (13%), OXA-1 (9%), TEM-1 (8%), PSE-4 (5%), TEM-2 (4%), PSE-3 (2%). Los datos reunidos por Tirado et al.³²⁷ en nuestro país son bastante coincidentes con este esquema, no obstante, la incidencia de TEM-1 (38%) es superior a la de otros estudios, mientras que en el Reino Unido PSE-4 (45%) es la BPC prevalente.

6.6.3 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

El epígrafe "betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado" (BPEA) comprende un grupo de nuevas enzimas de codificación plasmídica, derivadas de otras BPCs bien conocidas y ampliamente diseminadas entre las bacterias patógenas, que hidrolizan los ABL de 3ª generación incorporados al arsenal terapéutico a partir de 1980^{207,277}. En sentido literal, son BPCs que inactivan, además de los ABL clásicos, otro grupo de ABL de enorme interés por su resistencia a BPCs que hasta entonces configuraban el mecanismo de resistencia más común entre la población bacteriana. Con ser de suficiente relevancia la inactivación de la cefotaxima, ceftazidima o aztreonam, y más recientemente de cefoxitina, imipenem y meropenem, estas nuevas BPEA han venido a ratificar "el principio de acción y reacción" entre bacterias y antimicrobianos, vigente en el desarrollo de los ABL desde la implantación de la penicilina en los años 40.

La síntesis bacteriana de BPEA no deja de ser, por otra parte, "la crónica de un acontecimiento anunciado". Thatcher³³⁰ en 1975, llama a las BPCs "floppy enzymes" aludiendo a su versatilidad para conferir protección a la célula bacteriana. Hall y Knowles³³¹ en 1976, consiguen mutantes TEM-1 de *E. coli* con incremento del nivel de resistencia. A mediados de la década pasada, Medeiros y Jacoby²⁶² auguran la aparición de nuevas BPCs de espectro más amplio como respuesta al empleo de nuevos ABL. Recientemente, cuando era un hecho la existencia de nuevas BPEA inhibidas por el a. clavulánico, Bush³³² predice nuevas mutaciones en el genoma bacteriano que combinarán mayor espectro hidrolítico y pérdida de afinidad por los inhibidores. Todas estas premoniciones se han cumplido de manera puntual.

En 1983, Shah y Stille³³³ describen en Alemania, las primeras cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* con un fenotipo caracterizado por cierto grado de resistencia o "menor sensibilidad" a cefotaxima y ceftazidima. En el mismo año y también en Alemania, Knothe et al.³³⁴ documentan la transferencia de resistencia plasmídica a la cefotaxima en *Enterobacteriaceae*, y sugieren la presencia de nuevas β las o de un mecanismo de resistencia desconocido. En 1985, Kliebe et al.²⁴⁰ caracterizan en una cepa de *K. ozenae* del mismo origen que las anteriores, una nueva β la denominada SHV-2, derivada por mutación de SHV-1 y con idéntico pI, que confiere un perfil de resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. En años sucesivos se identificaron SHV-3, SHV-4 y SHV-5, también derivadas de SHV-1, que muestran características relacionadas³³⁵⁻³³⁷.

Breve tiempo después y de manera casi simultánea, se describen en Francia dos brotes epidémicos causados por *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* esencialmente, con elevado nivel de resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam^{338, 339}. En estas cepas se caracteriza una nueva β la plasmídica de pI 6.3, denominada inicialmente CTX-1 y posteriormente TEM-3 por su origen relacionado con TEM-2, que principia una "amplia saga" de nuevas β PEA de tipo TEM que por el momento finaliza en TEM-21^{21, 277, 340}. Recientemente, y como un paso más en la secuencia de respuestas del mundo bacteriano a la síntesis y empleo de nuevos antimicrobianos, se han identificado nuevas β PEA en *K. pneumoniae*, CMY-1³⁴¹, CMY-2³⁴², MIR-1³⁴³, que inactivan cefamicinas y moxalactam, y otra en *P. aeruginosa* que hidroliza imipenem y meropenem³⁴⁴. En resumen, en un periodo de 7 años se han identificado más de 50 nuevas β PEA que amplían considerablemente el espectro hidrolítico, de manera que no existe un solo ABL que no sea hidrolizado por alguna β PEA. Esta parece ser la consecuencia más inmediata de la amplia utilización de nuevos ABL en los últimos 10 años.

La base genética de estas nuevas β PEA se ha ido dilucidando progresivamente²⁰⁷. Poco después del hallazgo de SHV-2 y TEM-3 se demostró, por técnicas de hibridación, que ambas derivaban de SHV-1 y TEM-2^{345, 346}. En efecto, mutaciones puntuales en los genes que codifican estas enzimas dan lugar a modificaciones en la secuencia de aminoácidos, con redistribución y cambios en la estructura terciaria del enzima en torno al centro activo. En

consecuencia, cambian las propiedades del enzima y varía, también, la interacción β la-A β L^{347,348}. Este fenómeno supone una sorpresa relativa. Hall y Knowles³³¹ demostraron, ya en 1976, que la actividad catalítica de TEM-1 se podía alterar por mutación, obteniéndose la hidrólisis más efectiva de la cefalosporina C. Por otra parte, a expensas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se han obtenido mutantes con mayor espectro de actividad, diferente pI, y propiedades coincidentes con las β PEA encontradas en bacterias aisladas de muestras clínicas^{240,346}. Diversas β PEA han sido secuenciadas y el análisis de nucleótidos del gen β la ha demostrado que son suficientes mínimas alteraciones, para originar diferencias importantes en el comportamiento enzimático^{345,349-352}. Estas modificaciones en la secuencia de aminoácidos del enzima determinan cambios en el pI, y lo que parece de mayor trascendencia, variaciones en la afinidad y en la tasa de hidrólisis de las β PEA por los A β L de 3ª generación^{207,347,348,353}.

Las β PEA suponen un hecho de indudable relevancia tanto microbiológica como clínica. Las técnicas tradicionales de caracterización enzimática han de ampliarse, necesariamente, por la coincidencia de varias β PEA con el mismo pI, y por la menor eficiencia hidrolítica de muchos enzimas que dificulta los estudios sobre perfil de sustrato²⁰⁷. Actualmente, para la identificación de β PEA están más indicadas la inhibición competitiva de la hidrólisis del nitrocefín²³⁸, la secuenciación de nucleótidos y aminoácidos³⁴⁵, la hibridación ADN-ADN con sondas específicas³⁴⁹, y la hibridación con oligonucleótidos conocida como oligotipado²¹.

Desde el punto de vista clínico, la consecuencia más seria radica en la ampliación del espectro hidrolítico y, por tanto, en la limitación de las posibilidades terapéuticas. En pocos años, las bacterias han conseguido codificar elementos genéticos que permiten inactivar un número mayor de A β L. Hoy disponen de más de 50 β PEA distribuidas en 3 grupos en función del progresivo espectro de inactivación: aminotiazol-oxiimino β las que inactivan aminotiazol-oxiimino cefalosporinas y los antibióticos monobactámicos; cefamicinasas o metoxi- β las que, además, inactivan temocilina, cefamicinas y moxalactam; y en el punto álgido de su evolución un enzima, carbapenemasa, que hidroliza imipenem y meropenem. Este arsenal enzimático además de ser una ame-

naza evidente, supone un éxito considerable del mundo de las bacterias frente a las contumaces maniobras de diseño de nuevos ABL.

6.6.3.1 AMINOTIAZOL-OXIIMINO BETALACTAMASAS.

Conforman el grupo más amplio de BPEA, incluidas en la clasificación de Bush de 1989 en el subgrupo 2b', denominado "EBS-Y B-lactamasas", por su espectro expandido y por ser eficazmente inhibidas por el a. clavulánico. Son, por tanto, enzimas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de la 1ª generación, 2ª con excepción de las cefamicinas, 3ª generación excepto moxalactam, y los antibióticos monobactámicos^{354,355}. No incluyen en su espectro a los carbapenems y son inhibidas por a. clavulánico, sulbactam y tazobactam. La mayor parte de las cepas en las que se han identificado BPEA muestran resistencia a aminoglicósidos incluyendo amicacina.

Este perfil de sensibilidad debería facilitar su reconocimiento por medio de las pruebas de sensibilidad "in vitro". No obstante, las CMIs para algunos ABL, concretamente cefotaxima, ceftioxima y ceftriaxona, son en ocasiones bajas y teóricamente entran en el ámbito de lo erróneamente considerado como sensible por las clasificaciones al uso. La dispersión de valores obtenida por distintos autores para una misma BPEA no hace sino recalcar la necesidad de considerar criterios de poblaciones, además de los exclusivamente farmacocinéticos en la diferenciación entre cepas sensibles y resistentes. Desde un punto de vista práctico, la estimación al unísono de los resultados de difusión por disco ó CMI para cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, y la sinergia con inhibidores de B_{las} detectada por la técnica del disco doble, permite una identificación presuntiva con escaso margen de error³³⁹.

En las tablas 6 y 8 se resumen algunas de las características más relevantes de las enzimas descritas hasta la actualidad. Con la excepción de TEM-12, enzima de codificación cromosómica, el resto de las BPEA son codificadas por plásmidos de elevado tamaño (80-300 kb), que determinan resistencia a múltiples antibióticos y a algunos metales pesados, y pertenecen a un número limitado de grupos de incompatibilidad, C, FI, HI2 y M²²³.

Hasta ahora, no se ha podido demostrar la transponibilidad de los genes que gobiernan la síntesis de β PEA, aunque si la hibridación entre 8 plásmidos diferentes y sondas ADN sintetizadas con el gen *tnpR* del transposón Tn3³⁵⁶.

Por el momento, estas β PEA solamente han sido identificadas en **Enterobacteriaceae**, con mayor profusión en **Klebsiella** y en menor grado en **E. coli**. En alguno de los brotes epidémicos extensos y en ocasiones de manera aislada, también se han identificado aminotiazol-oxiimino β las en **Enterobacter**, **Citrobacter**, **Morganella**, **Serratia** y **Salmonella**³⁵⁷⁻³⁶⁰. Parece sorprendente la escasez de referencias de aislamiento de β PEA en **P. mirabilis**, especie en la que son frecuentes enzimas de tipo TEM-1 o TEM-2^{361,362}. Las denominaciones originales de cada enzima, referentes bien al lugar, hospital o país de aislamiento, bien al sustrato hidrolizado, se han ido modificando al tener en cuenta su procedencia de otras β las bien conocidas. Dentro del grupo, la subclasificación puede atender al origen, TEM vs. SHV, o a la diferente actividad hidrolítica sobre cefotaxima o ceftazidima.

El primer subgrupo de aminotiazol-oxiimino β las comprende un amplio número de enzimas derivadas por mutación de TEM-1 ó TEM-2. La mayoría se conocen con el epígrafe "TEM", mientras que al resto todavía no ha sido posible asignarles un nuevo ordinal o equipararlas a alguna de las ya caracterizadas. La secuenciación de nucleótidos del gen *bla* ha permitido demostrar que solamente son precisas entre una y cuatro modificaciones en la secuencia de aminoácidos, para codificar enzimas con propiedades diferentes de las originales²¹. TEM-6, 7, 12, 16, 17, 18 y 19, cambian un solo aminoácido, lisina o serina, en las posiciones 102, 162, y 236 con relación a TEM-1 ó TEM-2. TEM-3, 4, 5, 9, 11, 14 y 15 muestran un doble cambio, casi siempre serina y lisina, mientras que en TEM-8 se observan tres modificaciones que también incluyen serina y lisina. Su rango de pI entre 5 y 6.5 es característico del grupo y por su perfil de sustrato, eficiencia hidrolítica o relación CMI ceftazidima/CMI cefotaxima, podríamos hablar de cefotaximasas o ceftazidimasas. En este punto es necesario resaltar que aunque la tasa relativa de hidrólisis de muchas de estas β PEA es mayor para la cefotaxima que para la ceftazidima, las CMIs muestran una relación inversa, probablemente por la mejor penetración de la cefotaxima al espacio periplásmico²⁰⁷.

El segundo subgrupo es más reducido y en él se diferencian las cuatro enzimas SHV derivadas de SHV-1 conocidas hasta el momento^{240,335-337}. Todas ellas tienen pI entre 7 y 8.5, en lo que difieren claramente de las TEM, y muestran CMIs más elevadas tanto para la cefotaxima como para ceftazidima y aztreonam, aunque su eficiencia hidrolítica es mayor para la cefotaxima. En SHV-2, la primera β PEA descrita, un solo cambio en la secuencia de aminoácidos, serina por glicina en la posición 234, determina importantes variaciones en el perfil de sustrato y en la afinidad del enzima con respecto a SHV-1^{21,345,350}. En SHV-3 y SHV-5 se observan dos cambios en la secuencia de aminoácidos y tres en SHV-4, incluyendo siempre leucina, serina y lisina²¹. Estas modificaciones conllevan incrementos muy significativos en las CMIs, con un rango que oscila entre 32 y 256 ug/ml, para cefalosporinas de la 3ª generación y aztreonam³⁵⁵.

6.6.3.2 CEFAMICINASAS.

Constituyen un grupo de enzimas que inactivan los sustratos betalactámicos con un grupo metoxi en la posición 6 de las penicilinas, temocilina, y 7 de las cefalosporinas, cefamicinas y moxalactam. Considerando estrictamente su espectro podría ser más ortodoxo denominarlas metoxi- β las. Como las anteriores, sólo han sido identificadas en **Enterobacteriaceae**.

Bauerfeind et al.³⁴¹ describen en 1989 la primera β PAE que hidroliza la cefoxitina y otras cefamicinas. Esta β la de pI 8.0, denominada CMY-1, fué caracterizada en una cepa de **K. pneumoniae** aislada en Seúl. El patrón de resistencia, transferible, tenía de sobresaliente los elevados valores de CMI para cefoxitina, cefotetan, cefmetazol y moxalactam, y además para todos los nuevos ABL con la excepción de imipenem y meropenem (Tabla 8). El comportamiento de los inhibidores no era uniforme frente a CMY-1 y su eficacia, no muy elevada, dependía de la combinación a considerar. El sulbactam parece algo más activo que el a. clavulánico excepto en asociación con cefoxitina y cefotaxima donde mostraban eficacia similar. En general, tanto sulbactam como a. clavulánico eran más activos que tazobactam. De similares características es la β la CMY-2 o HEL-1 descrita en Grecia en una cepa de **K. pneumoniae**³⁴². Tanto su pI, 8.1, como su patrón de sensibilidad y su perfil hidrolítico son próximos

al de CMY-1. Tan sólo una mínima diferencia en el IEE y la sensibilidad a ceftazidima parecen diferenciarlas.

Recientemente se han publicado por autores ingleses datos preliminares de una nueva β PEA, BIL-1, con propiedades que nos sugieren su inclusión en el grupo de las cefamicinasas, aunque en el trabajo original no consten específicamente los datos de sensibilidad a la cefoxitina y otras cefamicinas³⁶³. Identificada en una cepa de *E. coli* aislada de un paciente procedente de Pakistán y tratado previamente con cefotaxima y amicacina, BIL-1 confiere resistencia a las cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación y a su asociación con 2 ug/ml de a. clavulánico. Con las reservas inherentes a los datos iniciales, el pI 8.8, el perfil de sustrato y la ausencia de inhibición por el a. clavulánico, están a favor de su inclusión en este grupo de β PEA.

Con todo, el prototipo de β PEA que hidroliza metoxi-ABL es el enzima MIR-1 descrito por Papanicolau et al. en 1990³⁴³. Se identificó en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de 11 pacientes, la mayoría quirúrgicos, tratados con nuevas cefalosporinas o cefoxitina y hospitalización prolongada entre Septiembre de 1988 y Junio de 1989, en Providence (EE.UU). Constituye el primer brote de infección nosocomial en el que se ha demostrado fehacientemente la participación de una cefamicinasa. El patrón de sensibilidad conferido por MIR-1 (Tabla 8) no es distinto del de otras cefamicinasas, aunque muestra mayor grado de resistencia a moxalactam y temocilina. Sorprendentemente, la secuencia del gen que codifica MIR-1 muestra un 90% de homología con el gen AmpC de *E. cloacae* P99, mientras que no hibrida con AmpC de *E. coli*, ni con TEM o SHV. Se trata, por tanto, de una β la plasmídica no inducible, con aspectos genéticos y bioquímicos más coincidentes con las β las cromosómicas inducibles de *Enterobacteriaceae*. En efecto, MIR-1 tiene un pI de 8.4, un perfil de sustrato típico de cefalosporinasa y un perfil de inhibición también coincidente con el de las β las cromosómicas Clase I, en tanto en cuanto la efectividad de los inhibidores es exigua.

Sin duda, la síntesis de β PEA que inactivan las cefamicinas es un paso más en la evolución de las β las hacia el "espectro total". Las características del brote protagonizado por MIR-1 permiten sospechar que no se trata de la diseminación de una

sola cepa, sino más bien la probable adquisición por distintas cepas de *K. pneumoniae* de un plásmido conjugativo Inc C que porta el gen Amp^C³⁴³. La presión selectiva del empleo de cefamicinas e inhibidores de β las ha debido jugar un papel importante en la definitiva selección de estas cepas. El peligro inherente a estas nuevas β PEA no es solamente su potencial diseminación, sino las escasas posibilidades terapéuticas, limitadas casi exclusivamente, a los carbapenems.

6.6.3.3 CARBAPENEMASA.

La inactivación enzimática de imipenem por β las cromosómicas del tipo metaloenzima es un hecho conocido e infrecuente en los aislamientos habituales que causan patología infecciosa³⁶⁴. Por ello, la identificación en *P. aeruginosa* de la primera β PEA que hidroliza imipenem y meropenem es más relevante por el huesped bacteriano que la alberga, primera β PEA en *P. aeruginosa*, por la amplísima limitación terapéutica que determina, y por su eventual posibilidad de diseminación dado el carácter plasmídico que la distingue³⁴⁴.

Esta primera carbapenemasa plasmídica ha sido caracterizada recientemente en una cepa de origen clínico, *P. aeruginosa* GN 17203, aislada en Japón en 1988, y tiene un pI de 9.0. Confiere resistencia al imipenem (50 ug/ml) y meropenem (100 ug/ml), así como a la carbenicilina, ceftazidima, cefoperazona, cefsulodina y moxalactam (>400 ug/ml); por el contrario se muestra más sensible a la piperacilina y aztreonam (25 ug/ml). Es un enzima con mayor afinidad por el meropenem que por el imipenem, y un amplísimo perfil hidrolítico que incluye las cefamicinas, moxalactam y las oximiino cefalosporinas, aunque no hidroliza el aztreonam. No es inhibida por los inhibidores betalactámicos pero sí por EDTA y p-cloromercuriobenzoato. Estas y otras propiedades bioquímicas permiten sugerir su adscripción al grupo de los metaloenzimas.

TABLA 8.- CARACTERISTICAS DE LAS BETALACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO.

<u>Betalactamasa</u>	<u>pI</u>	<u>Perfil de sensibilidad. CMI en ug/ml.</u>			
		<u>CTX</u>	<u>CAZ</u>	<u>FOX</u>	<u>IMP</u>
<u>I Oxiimino betalactamasas</u>					
TEM-3 (CTX-1)	6.3	0,5-256	1-128	2-32	0,06-2
TEM-4	5.9	4-32	8-64	4-8	0,03-0,2
TEM-5 (CAZ-1)	5.55	1-16	16-128	1-32	0,03-0,2
TEM-6	5.9	0,5-2	64-256	4-32	0,1-0,2
TEM-7 (TEM-201)	5.41	0,06-0,5	8-64	2-256	0,06-0,5
TEM-8	5.9				
TEM-9 (RHH-1)	5.5	2-4	128->128	4-16	0,5
TEM-10 (TEM-E3)	5.57	0,2-1	32-64	2-8	*0,5
TEM-11 (CAZ-10)	5.6	0,03-0,1	2-8	2-4	0,2
TEM-12 (TEM-101)	5.25	0,2-0,5	32-64	2	1
CAZ-2	6.0	4-64	64-128	4-16	0,1-0,2
CAZ-3 (TEM-E2)	5.3	0,1-1	64-128	4-16	0,2
CAZ-6	6.5	8	512	4	0,5
CAZ-7	6.3	4	256	8	0,5
CAZ-hi	6.5	0,2-1	32-256	2	0,2
TEM-E1	5.41	0,1-0,2	16-32	1-8	0,2-0,5
MJ-1	5.35		40,5		
FUR	7.5	1-2	2-16	2-4	0,2
YOU-1	5.57	1	256	8	0,5
YOU-2	5.2	0,5	64	16	0,2
SHV-2	7.6	2-64	4-32	2-16	0,06-0,5
SHV-3	6.98	2-64	1-32	16	0,1-0,2
SHV-4 (CAZ-5)	7.8	1-128	16-256	16	0,2-0,3
SHV-5 (CAZ-4)	8.2	4-64	64-128	8-32	0,06-0,2
FEC-1	8.2	200	12,5-25	1,5-6,2	0,3-0,7
<u>II Cefamicinasas</u>					
CMY-1	8.0	64-128	4	256-512	0,2
CMY-2 (HEL-1)	8.1	32	128->128	256-512	0,2
MIR-1	8.4	64	128	>256	1
BIL-1	8.8	2-16	4->16	R	S
<u>III Carbapenemasa</u>					
Sin nombrar	9.0	400		50	

* Datos tomados de las referencias 207, 277, y de nuestra experiencia.

6.6.4 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO AMPLIADO: RESISTENCIA Y REPERCUSION CLINICA.

Las enormes expectativas terapéuticas que suscitaron los nuevos ABL, se vieron ciertamente comprometidas ante las primeras publicaciones que describían nuevas β las capaces de hidrolizarlos y el fracaso terapéutico subsiguiente a su utilización en diversos tipos de infecciones^{338,339,365}. No es sorprendente, por tanto, la alarma inicial de microbiólogos y clínicos ante lo que podía ser un hecho de marcada trascendencia. No obstante, el importante caudal de conocimientos generados hasta hoy, y el tiempo transcurrido, nos permiten relativizar la repercusión clínica de las nuevas β PEA y analizar el problema con una perspectiva algo distinta a la inicial^{332,366}.

Desde un punto de vista exclusivamente clínico, la repercusión mayor de las β PEA radica en la gran limitación terapéutica que condiciona su espectro hidrolítico, sobre todo en aquellas infecciones en las que se consideran fármacos de primera elección. No podemos olvidar por otra parte, que con notables excepciones, la mayoría de las β PEA se han aislado de forma esporádica y con una incidencia global baja considerando el total de aislamientos que se producen en un hospital. Entendemos, en consecuencia, que la repercusión clínica de las β PEA pueda ser muy variable y de pendiente de múltiples factores relacionados con la epidemiología del microorganismo, del plásmido y de cada enzima, así como del paciente y su estado clínico, y del tipo de infección. Analizando la epidemiología de cada una de las β PEA y las circunstancias en las que se han identificado, y asumiendo el riesgo inherente de una excesiva simplificación, podemos diferenciar cuatro grupos o situaciones distintas, cada una con implicaciones clínicas diferentes.

SHV-2, primera β PEA conocida, conforma un grupo único por su epidemiología particular³⁵⁷. Limitada, casi exclusivamente, a *Klebsiella* y *E. coli* es un enzima con difusión universal identificada en microorganismos aislados en múltiples países de cuatro continentes²⁰⁷. En general, no ha dado lugar a brotes epidémicos amplios, su aislamiento en muchas ocasiones es esporádico, e incluso se ha encontrado en cepas de pacientes procedentes de la comunidad³⁶⁷. Todas estas peculiaridades le confieren un amplio relieve microbiológico y menor trascendencia clínica.

Muy distintas son las circunstancias en torno a TEM-3 y SHV-4, que configuran un grupo con distinta significación clínica^{336, 338, 339, 359, 368, 369}. Se trata de BPEA encontradas prioritariamente en un solo país, Francia en este caso, en la mayoría de las especies de *Enterobacteriaceae*, y codificadas por plásmidos que tienen asociada la resistencia a todos los aminoglicósidos, con la excepción de gentamicina. Integran el grupo de BPEA que han dado lugar a brotes epidémicos amplios de infección nosocomial, con más de 100 aislamientos y un número elevado de pacientes involucrados. En general, son enfermos ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos y en menor proporción en otras áreas de hospitalización, con múltiples factores de riesgo asociados y tratamiento previo con nuevos ABL y aminoglicósidos. La presencia de estas BPEA se ha asociado con fracaso terapéutico y 10-20% de mortalidad, aunque la situación crítica propende a la evolución favorable después de la asunción de medidas correctoras. Es evidente que en este grupo de BPEA la repercusión clínica ha sido relevante.

Un tercer grupo de BPEA de repercusión clínica intermedia o moderada se puede extraer con aquellas enzimas que han dado lugar a brotes epidémicos limitados por su extensión. Suelen afectar a pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos o en otros lugares de hospitalización, en hospitales grandes o en alguno con menos de 350 camas, afectos de patología infecciosa muy variada y estado clínico diverso, aunque, por lo general, más del 50% han recibido previamente una cefalosporina de 3ª generación y un aminoglicósido. Estas BPEA se han caracterizado en *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* además de en *E. coli* y *Klebsiella* pero siempre en un número que no suele exceder de 20 aislamientos en cada episodio. Las Bías TEM-4, 5, 6, 8, 11 y 12³⁷⁰⁻³⁷⁵, CAZ-2, 6 y 7³⁷⁶⁻³⁷⁸, SHV-3 y 5^{335, 337}, YOU-1 y 2³⁷⁹ y MIR-1³⁴³, constituyen los representantes más genuinos de este grupo, cuya trascendencia clínica ha sido, por el momento, limitada exclusivamente a sus ámbitos de aislamiento.

Finalmente, es posible conformar un cuarto grupo con todas aquellas BPEA caracterizadas en "aislamientos aislados", es decir, enzimas encontradas habitualmente en una sola cepa y en un solo lugar y cuya repercusión clínica, por el momento, es extraordinariamente reducida. En este grupo se incluirían TEM-7, 9, 10, 13-19^{21, 380-382}, TEM-E1 y E4³⁸³, CAZ-3³⁷⁹, CAZ-hi³⁷⁴,

FUR³⁷⁴, MJ-1 y 2³⁸⁴, así como las cefamicinasas CMY-1 y 2³⁴¹, 342 y la única carbapenemasa descrita³⁴³. Que en un próximo futuro alguna de estas β PEA deba cambiar de grupo por sus implicaciones clínicas mayores pertenece al ámbito de la especulación.

En resumen, las nuevas β PEA suponen un paso adelante en la evolución de las posibilidades de resistencia del mundo bacteriano hacia los ABL. Un nuevo paso que no por esperado deja de ser significativo considerando las implicaciones genéticas, microbiológicas y clínicas. Por el momento, y en función de los datos de que disponemos, solo parece factible evaluar parcialmente la repercusión de las nuevas β PEA. Su incidencia entre los microorganismos patógenos no parece muy elevada, aunque es posible que su identificación haya sido subestimada por los valores de sensibilidad. La limitación exclusiva a **Enterobacteriaceae** no es fácilmente explicable tras el análisis comparativo con otras β las plasmídicas de las que proceden por mutaciones genéticas. La posible codificación por transposones, la disponibilidad de un "pool genético" entre la población bacteriana y su diseminación a otras especies, como **Pseudomonas**, **Haemophilus**, **Neisseria** y **Branhamella** podrían cambiar, al menos para alguna de las β PEA, su consideración clínica en el futuro.

6.7 BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS DE GRAM-NEGATIVOS.

El cromosoma bacteriano como estructura genética que promueve la síntesis de β las da lugar a un heterogéneo grupo de enzimas, a cuya multiplicidad responden la diversidad de propiedades enzimáticas y el abanico de posibilidades de inactivación de ABL. Virtualmente, todas las bacterias gram-negativas estudiadas producen una β la cromosómica específica de especie y, a veces, de subespecie²⁰⁹. Aunque todavía no se ha concretado la posible función fisiológica de la β la de muchas bacterias, en otros casos está bien delimitada su responsabilidad en la resistencia múltiple a ABL y en el fracaso terapéutico.

La homología genética entre estas β las parece elevada, sugiriendo un origen evolutivo común, y tal vez punto de partida de β las plasmídicas²⁶³. La propia evolución y la especificidad de cada grupo de bacterias explica la disparidad relativa en cuan-

to a sus propiedades: pI, perfiles de sustrato e inhibición, control genético y modalidades de expresión, mecanismos y amplitud de la resistencia, e incidencia y significación clínica. De la década de los años 60 datan los datos iniciales que involucran a las β las cromosómicas (β CR) en la resistencia a ABL. No obstante, ha sido a partir de 1980 cuando se ha configurado en toda su extensión las enormes implicaciones de estas enzimas en la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, antibióticos monobactámicos y carbapenems. De manera progresiva se han publicado excelentes revisiones sobre el tema, que han ido perfilando la magnitud de un problema que añadido al inherente a las β las plasmídicas, conforma el mecanismo de resistencia que ha permitido el mayor desarrollo de la antibioterapia^{206,209,211,261,263-265,268,340,385-387}.

6.7.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Las β CR son enzimas de PM elevado que oscila entre 30 y 42.000 D, con pIs usualmente alcalinos, aunque algún grupo minoritario muestra valores en el rango ácido^{209,323}. Todas las β las caracterizadas a nivel molecular pertenecen a la clase C, con residuo serina en su sitio activo que es acilado por los ABL como paso intermedio en la hidrólisis enzimática^{388,389}. Su PS es típico de cefalosporinasas, con tasa relativa de hidrólisis y V_{max} mayores para cefalosporinas que para penicilinas, lo que no es óbice para que también hidrolícen penicilinas con relativa eficiencia^{323,389,390}. Su PI, peculiar por la sensibilidad a cloxacilina y resistencia a pCMB, a. clavulánico y sulbactam, las diferencia con claridad de las β las plasmídicas.

Todas las β CR, independientemente del enzima y sustrato que se consideren, catalizan la misma reacción en la que se forma un enlace covalente y se destruyen dos²⁰⁶. En principio se forma un enlace no covalente E.S con un acilenzima intermedio, para dar lugar después a una unión covalente E-S con rotura del enlace betalactámico. El final de la reacción supone la deacilación que origina el enzima regenerado y el sustrato betalactámico hidrolizado Si. Es interesante resaltar que ninguno de los compuestos intermedios tiene actividad biológica, y que el paso limitante en la reactividad de las β CR es la deacilación, mientras que para las β las plasmídicas lo era la formación del

enlace covalente en la segunda etapa del proceso. Esta diferencia tiene su repercusión en la resistencia a ABL, al estimar la interacción entre las BCR y los nuevos ABL de la 3ª generación.

La características más definitorias de las BCR hacen referencia al PS, a su codificación y regulación genética, a los modelos de expresión y a los mecanismos que determinan la resistencia a ABL. Sin duda, todos estos aspectos están muy relacionados entre sí y condicionan un comportamiento peculiar que hace de las BCR enzimas genuinos. En general, el PS de las BCR es patognomónico del perfil cefalosporinasa, aunque es preciso reconocer las dificultades que conlleva el estatuir el verdadero perfil de cada enzima, a la luz de los abundantes datos publicados. En realidad, no son tantos los estudios bien diseñados con enzimas purificadas y múltiples substratos. Por otra parte, las condiciones de los ensayos "in vitro" con exceso de substrato y baja concentración enzimática, no reflejan la realidad del espacio periplásmico invalidando algunas conclusiones preliminares. A todo ello hay que añadir la variabilidad de los parámetros cinéticos entre géneros y especies bacterianas distintas. Suponiendo cierta uniformidad cinética para todas las BCR y atendiendo a valores predeterminados de afinidad (Km) e hidrólisis (Vmax), en términos de alta, moderada y baja, Sanders³⁸⁶ establece nueve combinaciones posibles, en siete de las cuales se puede adscribir algún ABL, que hacen más fácil predecir el resultado de la interrelación Bla/ABL (Tabla 9).

Es evidente que aquellos ABL por los que las BCR tengan elevada afinidad y alta o moderada tasa de hidrólisis tendrán la mayor posibilidad de ser muy eficazmente hidrolizados. Es remarcable que en estos dos grupos no se incluya ninguno de los compuestos betalactámicos habituales en la terapéutica clínica. En el escalón siguiente, ABL con afinidad moderada y tasas de hidrólisis alta o media y ABL con baja afinidad y alta tasa de hidrólisis, se agrupan los antibióticos mejor inactivados que muestran porcentajes de resistencia próximos al 100%: cefalotina, cefaloridina, cefalexina, cefazolina y también penicilina G. En el extremo opuesto se alinean ABL con distinta afinidad, incluso elevada en muchos casos, cuya baja tasa de hidrólisis determina la inactivación efectiva sólo en aquellos casos en los que el nivel enzimático es muy alto por desrepresión de los mecanismos reguladores de la producción. En estos subgrupos se in-

TABLA 9.- PARAMETROS CINETICOS DE LAS BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS.

<u>Parámetros cinéticos</u>		<u>Betalactámicos</u>
1) <u>Alta afinidad</u> <u>Alta hidrólisis</u>	Km <1 uM Vmax >100 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Ninguno.
2) <u>Alta afinidad</u> <u>Moderada hidrólisis</u>	Km <1 uM Vmax >1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Ninguno.
3) <u>Alta afinidad</u> <u>Baja hidrólisis</u>	Km <1 uM Vmax <1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Ampicilina Carbenicilina Cloxacilina Cefuroxima Cefoxitina Cefmetazol Cefotaxima Moxalactam Aztreonam Imipenem
4) <u>Moderada afinidad</u> <u>Alta hidrólisis</u>	Km >1 uM Vmax >100 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Cefalotina
5) <u>Moderada afinidad</u> <u>Moderada hidrólisis</u>	Km >1 uM Vmax >1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Penicilina G Cefalexina Cefamandol Cefoperazona
6) <u>Moderada afinidad</u> <u>Baja hidrólisis</u>	Km >1 uM Vmax <1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Ceftazidima
7) <u>Baja afinidad</u> <u>Alta hidrólisis</u>	Km >100 uM Vmax >100 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Cefaloridina Cefazolina
8) <u>Baja afinidad</u> <u>Moderada hidrólisis</u>	Km >100 uM Vmax >1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Cefotiam
9) <u>Baja afinidad</u> <u>Baja hidrólisis</u>	Km >100 uM Vmax <1 nmol, min ⁻¹ , mg ⁻¹	Cefpiroma

* Datos tomados de la referencia 386.

cluyen las penicilinas semisintéticas, cefalosporinas de 3ª generación, aztreonam, imipenem y meropenem. A la luz de este ordenamiento, parece indudable que la tasa relativa de hidrólisis o la V_{max} tienen mayor repercusión que la afinidad en la inactivación enzimática. No obstante, no se pueden adscribir con absoluta fidelidad estos datos a los resultados obtenidos en el antibiograma, toda vez que las variaciones en la afinidad son notables aún dentro de un mismo grupo, y que además en la resistencia influyen otros parámetros que analizaremos con posterioridad³⁹⁰.

En los últimos años se ha avanzado de manera sustancial en la dilucidación de los mecanismos genéticos que regulan la síntesis de BCR, aunque hoy solamente conozcamos parcialmente su estructura y función²⁶³. Los mayores progresos se han alcanzado merced a la similitud del gen estructural *ampC* de *E. coli* con los que codifican la síntesis en *C. freundii* y *E. cloacae*. Aunque la regulación de la producción de enzima en *E. coli* es distinta, la similitud entre los productos de los genes estructurales permite sugerir un origen evolutivo común. Bergstrom et al.²¹⁹ en 1982, utilizando una sonda ADN del gen *ampC* marcada con p^{32} demuestran amplia homología entre los genes de *E. coli* K₁₂ y *Shigella*, al detectar secuencias homólogas. En el mismo año, Knott-Hunziker et al.³⁸⁸ ponen de relieve que la secuencia parcial de aminoácidos en torno al centro activo de la BCR de *P. aeruginosa*, también exhibe amplia homología con la de *E. coli*. Parece confirmado que el operón *Bla* asume el gen estructural *ampC*, similar para todas las BCR, y un complejo sistema de regulación diferente para las *Bla*s constitutivas e inducibles, que controla la expresión a nivel de transcripción u traducción, en el que se delimitan los genes *ampR*, *ampD* y *ampG*, cuya estructura y funcionalismo no están definitivamente establecidos.

Otro aspecto diferenciador de las BCR en relación con las BP radica en las modalidades de expresión enzimática, que posibilita la discriminación de dos grupos extensos en función de que la expresión sea constitutiva o inducible, y que ha sido estudiada en profundidad^{263,265,391,392}. En el grupo primero, *Bla*s cromosómicas constitutivas (BCR), se incluyen las enzimas de *E. coli*, *Shigella*, *Proteus* y *Yersinia*, cuyo nivel de producción habitualmente bajo no ocasiona resistencia importante a AB_L,

sino a expensas de mutaciones en el operón *Bla* que causan incrementos más o menos significativos de la tasa de producción enzimática. El segundo gran grupo, *Blas* cromosómicas inducibles (BCRI), de mayor repercusión en la resistencia, lo integran las *Blas* de **Enterobacter**, **Citrobacter**, **Serratia**, **Morganella**, **Providencia**, **P. vulgaris**, **Pseudomonas** y **Acinetobacter**, presentes en más del 90% de los aislamientos. La síntesis de estas *Blas* es susceptible de modificarse al alza por mecanismos de inducción con substratos betalactámicos y no betalactámicos, o por fenómenos de mutación genética. Ambos se dan en idénticos microorganismos, de forma que la población capaz de ser inducida transitoriamente en su producción de *Bla*, alberga mutantes en proporción que oscila entre 10^{-5} y 10^{-8} con producción desreprimida, elevada y estable del enzima. Estos mutantes, pueden hacerse dominantes entre la población bacteriana como consecuencia de la selección "in vivo" por el tratamiento con ABL. Así se llega a la resistencia clínica a múltiples ABL y al fracaso terapéutico en el 10-50% de los pacientes infectados con estas especies. Constituyen un grave problema de infección nosocomial que afecta, esencialmente aunque no de forma exclusiva, a pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos, Unidades de Fibrosis Quística y Unidades de Quemados, y de forma más concreta a pacientes de alto riesgo e inmunodeprimidos^{266,270,271,393-396}.

El último aspecto, polémico y enormemente debatido, que atañe a las BCR y las diferencia de sus homónimas plasmídicas, hace referencia a los mecanismos mediante los que se alcanza la resistencia a ABL. El desarrollo de nuevos ABL, teóricamente resistentes a la hidrólisis pero inactivados en la práctica, ha suscitado en la última década la elaboración de hipótesis que avinieran semejante divergencia. La cuestión primordial a armonizar radica en explicar como enzimas "que no hidrolizaban al antibiótico in vitro" podían mediar resistencia en células intactas³⁹⁷. Dos teorías, en principio antagónicas, se han esgrimido para encontrar una explicación convincente. En los primeros años de la década de 1980 se habla del "trapping, atrapamiento o efecto de esponja", un fenómeno no hidrolítico que impide la llegada del ABL a las PBPs esenciales por formación de complejos no covalentes *Bla*/ABL, como causa mayor de la resistencia^{266,398,399}. Diversos estudios publicados a partir de 1985, demuestran la hidrólisis lenta pero efectiva de ABL que son po-

bres substratos. El desarrollo de ensayos con elevadas concentraciones enzimáticas y pequeñas de ABL, más acordes con las del espacio periplásmico tras la desrepresión enzimática, hacen patente la hidrólisis en tasas más elevadas que las de penetración del antibiótico en la célula^{116,215,400-402}. Aún atribuyendo más verosimilitud a la hidrólisis, probablemente ambos modelos son compatibles y configuran un mecanismo de resistencia de notable eficacia²⁰⁶.

6.7.2 EXPRESION GENETICA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Hasta que no se perfile algún papel para las BCR en la fisiología bacteriana, deberemos presuponer que la resistencia a ABL es el motivo central de su existencia. La modalidad de expresión genética configura dos grandes apartados: BCR_C y BCR_I, e incide de forma definitiva en la resistencia. Para que esta se alcance, se requieren concentraciones elevadas de enzima en el espacio periplásmico obtenibles, bien de forma transitoria tras la inducción enzimática, bien de forma estable a expensas de fenómenos mutacionales ocurridos, generalmente, de manera espontánea. La utilización de una sola vía, mutación, por la BCR_C, o la posibilidad de acceder a la resistencia por ambas de las BCR_I, marca otra diferencia esencial en la fisiología de ambos tipos de enzimas.

La BCR amp^C de *E. coli* es el prototipo de enzima que se expresa de modo constitutivo. El gen estructural amp^C determina una expresión enzimática pobre, o de bajo nivel, debida a un promotor ineficiente y a la acción de un atenuador entre el gen estructural y el promotor⁴⁰³. De esta manera, menos de la cuarta parte de la información transcrita por el promotor escapa a la atenuación y en estas condiciones difícilmente se pueden alcanzar niveles que provoquen resistencia. No obstante, al menos en *E. coli*, se han descrito mutantes hiperproductores de β la que determinan grados progresivos de resistencia en función del nivel de enzima producido^{265,403-407}. La existencia de múltiples copias del gen amp^C es la causa más frecuente de síntesis elevada, si bien el incremento de la tasa de transcripción por mutaciones que afectan al promotor ó atenuador también ha sido invocado^{265,405,408}. Sea como fuere, la concentración de β la en el espacio periplásmico puede ser entre 2 y 20 veces mayor que

la basal, ocasionando un incremento sustantivo de las CMIs de muchos ABL, entre ellos la ampicilina y las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, mientras que las carboxi y ureidopenicilinas se ven menos afectadas^{140,404,409}.

Las β CR de *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* son el modelo de enzimas inducibles cuyo nivel de producción puede elevarse por inducción o mutación, muy por encima del de las β CRC tras mutación. En el pasado cercano, se ha generado cierto grado de confusión a expensas de estos dos fenómenos distintos en su génesis, pero próximos tanto en el resultado final, la desrepresión enzimática, como en los microorganismos susceptibles de convocarlos. En la transitoriedad de la inducción frente a la estabilidad de la mutación radica la esencia de la diferenciación²⁰⁶.

La inducción enzimática es un fenómeno reversible que determina concentraciones transitorias y elevadas de β la tras la exposición del microorganismo a un inductor, generalmente un ABL^{206,264,266,386,390,410-416}. Los máximos niveles de enzima, se alcanzan entre 30 minutos y dos horas, y permanecen elevados mientras se mantiene la presencia íntegra del inductor. Su eliminación física o la hidrólisis del enlace betalactámico hacen declinar con rapidez la producción de enzima. El empleo de altas concentraciones de inductor puede ocasionar la falta de inducción por inhibición y lisis bacteriana. Las células bacterianas en fases de crecimiento lag o semilogarítmica responden adecuadamente a la inducción, mientras que la fase estacionaria la invalida. La inducción puede verse afectada por la represión catabólica con glucosa, anaerobiosis, o aporte de AMP cíclico de origen exógeno^{410,417}. Por otra parte, se ha demostrado que la inducción puede prevenirse mediante inhibidores de la síntesis proteica o del ARN, sugiriendo que para que la inducción ocurra es precisa la síntesis de una nueva proteína⁴¹⁸. Además de la inducción específica por ABL, se ha objetivado inducción inespecífica por diferentes compuestos: tiamina, a. fólico, hemina y triptófano, y por distintos fluidos orgánicos: LCR, líquido ascítico, líquido pleural, lo que sin duda puede tener mayor trascendencia.

Como no podría ser, posiblemente, de otra manera, los ABL son los agentes inductores por excelencia y la determinación de la

capacidad de inducción es un test obligado en la evaluación de un nuevo antimicrobiano^{217,264,266,267,390,410-413,419-421}. La inducción por ABL está sujeta a variables que atañen al antibiótico, a la concentración inductora y al tiempo de inducción. Por otra parte, a igualdad en estas condiciones, la idiosincrasia de cada especie bacteriana modifica la respuesta. Atendiendo al nivel enzimático promovido, hablamos de bajos o pobres inductores si el nivel producido por el contacto con concentraciones subinhibitorias de ABL es bajo o moderado²⁶⁹. Las carboxi y ureidopenicilinas, la mayor parte de las cefalosporinas incluyendo las de 3ª generación, el aztreonam y los inhibidores de β las, se pueden considerar inductores bajos o moderados. Los inductores potentes, 6 APA, penicilina G, ampicilina, cefamicinas y carbapenems, dan lugar a altas concentraciones de β la tras la inducción con concentraciones por debajo de la CMI.

El mecanismo molecular responsable de la inducción no se conoce con exactitud, si bien se han realizado avances notables cuando los genes responsables de la regulación han sido clonados. Estudios genéticos recientes indican que al menos 4 genes, *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*, intervienen en la regulación del gen estructural, y que la inducción por ABL ocurre mediante la acción directa del antibiótico que interacciona con los locus citados o con sus productos^{265,422-424}. Una vez producida la inducción se incrementa la producción de β la, con diferente alcance "in vitro" e "in vivo". Los tests de laboratorio no siempre detectan con fiabilidad la magnitud de la inducción. Sólo los realizados con ABL buenos inductores o aquellos en los que expresamente se busque la inducción, técnica del doble disco, revelarán las posibilidades de inactivación antimicrobiana. La discrepancia con los resultados clínicos no es infrecuente, aunque la repercusión de la inducción en la resistencia clínica depende de factores adicionales que analizaremos más adelante.

La desrepresión estable por mutación genética es un fenómeno de mayor trascendencia clínica "per se" y por las posibilidades de selección de mutantes resistentes que promueve^{267,425-432}. Ocurre de manera espontánea en los mismos microorganismos que codifican β CRI a una tasa de 10^{-6} - 10^{-8} y a través de alteraciones en el operón β la, dando lugar a niveles constitutivos y muy elevados de enzima^{209,266,267,410,421,427,430-435}. En *Enterobacteriaceae* a la mutación sigue la desrepresión total^{267,426},

427, mientras que en *Pseudomonas*, son precisas mutaciones consecutivas para alcanzar la desrepresión completa^{267,425,436-438}. En ambos casos se trata de mutaciones muy estables, contumaces en la síntesis elevada de β las a pesar de pasos sucesivos en medios sin ABL. La similitud entre las β las previa y posterior a la desrepresión ha sido puesta en tela de juicio al detectarse diferencias en algunas de sus propiedades. Mientras que determinados estudios han encontrado escasa divergencia, otros confirman discrepancias en el pI, PS y otras características cinéticas. En algunos microorganismos, la transcripción de varios genes estructurales puede dar lugar a "aparentes múltiples enzimas". En otros puede ser el reflejo de diferentes formas moleculares producto de un mismo gen^{417,425-428,436}.

Desde el prisma de la resistencia a ABL, la mutación espontánea con ser importante no es sino un paso previo para la selección de cepas con producción desreprimida de β la. De hecho el inóculo bacteriano utilizado en los antibiogramas convencionales hace casi imposible la detección de mutantes, si no se ha verificado la selección y dominancia dentro de la población. En este sentido la capacidad de selección por ABL de mutantes desreprimidos es más relevante que la propia capacidad de inducción, de manera que para alcanzar la resistencia clínica se precisa un número elevado de células con producción desreprimida del enzima. Es por tanto una cierta falacia adscribir a un ABL débil capacidad de inducción como garante de su eficacia, si no se considera al unísono su capacidad de selección. Los ABL varían mucho en su habilidad para seleccionar mutantes desreprimidos. Por diferentes razones, que más tarde consideraremos, las penicilinas semisintéticas, las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, las cefamicinas, y los penems y carbapenems, tienen baja capacidad de selección. En el extremo opuesto, las cefalosporinas de 3ª generación y los antibióticos monobactámicos son excelentes selectores de mutantes desreprimidos. En esta cualidad negativa radica su punto débil como agentes terapéuticos en el tratamiento de infecciones graves por microorganismos con tasa de mutación discreta o elevada^{206,269,386}.

La desrepresión enzimática, por una u otra vía, tiene un reflejo evidente en las CMIs de cada uno de los ABL. Incrementos de 4-16 veces son usuales para la carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina y piperacilina; elevaciones más remarcables, 64-256

veces, son usuales para aztreonam y las cefalosporinas de 3ª generación, mientras que los valores de CMI se mantienen invariables para mecilina y carbapenems. La cuestión, casi enigma, debatida ampliamente durante los pasados diez años estriba en el "modus operandi" mediante el cual la hiperproducción de enzima ocasiona la resistencia, especialmente para aquellos ABL considerados substratos pobres en función de los valores de V_{max} . Como ya se ha comentado, se han esbozado dos hipótesis en principio divergentes para encontrar una explicación convincente. Según la primera, el atrapamiento del ABL por las β las en el espacio periplásmico impide la saturación de las PBPs esenciales por formación de complejos no covalentes β la/ABL^{266,398,399,439}. No exenta de múltiples críticas que ponían en tela de juicio su verosimilitud, hoy se estima posible siempre que el complejo β la/ABL se frague mediante unión covalente^{440,441}. La segunda, recogida en diversos estudios publicados a partir de 1985, enfatiza la hidrólisis lenta pero efectiva de ABL que son pobres substratos^{116,215,386,400-402}. El desarrollo de ensayos con elevadas concentraciones enzimáticas y pequeñas de ABL, equiparables a las del espacio periplásmico tras la hiperproducción, hacen patente la hidrólisis en tasas más elevadas que las de penetración del antibiótico en la célula. Atribuyendo más eficacia a la hidrólisis, ambos mecanismos pueden ser compatibles configurando una forma de resistencia muy eficaz^{206,439}.

El desarrollo de la reacción enzimática y los tests que permiten evaluarla; la capacidad de las β las de proteger a la bacteria en sintonía con la tasa de entrada del ABL en la célula; y el n.º, tipo y localización de las PBPs esenciales, arrojan la luz necesaria para considerar los mecanismos de resistencia citados de una forma global³⁸⁶. Respecto de la cinética enzimática hay que puntualizar que no todos los binomios β la/ABL ocasionan las mismas concentraciones de S, E.S, E-S y Si, y que sólo la forma libre es activa para la saturación de las PBPs. Por otra parte, no todos los métodos que monitorizan la reacción estiman correctamente todos los complejos formados. Mientras la evaluación de buenos substratos no se ve influenciada por el método seguido, los resultados obtenidos con substratos pobres varían en función de la técnica ensayada. En definitiva, hasta que no se disponga de métodos que permitan valorar de forma real todos los pasos de la reacción, no podremos evaluar con precisión la participación de cada mecanismo en la inactivación³⁸⁶.

Después de la desrepresión enzimática, en el espacio periplásmico existe un elevado nivel de β la en torno a 10^5 moléculas $215,390$, y mucho menor concentración de antibiótico¹¹¹. En estas condiciones, la afinidad y tasa de hidrólisis del enzima, el nivel de permeabilidad de cada ABL a través de la ME, y el n° de PBPs objeto de saturación, configuran patrones de comportamiento distintos para cada ABL³⁸⁶. Antibióticos como la ampicilina y las cefalosporinas de 1ª generación, con afinidad y tasa de hidrólisis moderadas o altas, se muestran ineficaces al generar mucho sustrato en forma hidrolizada Si, con escasa o nula concentración de antibiótico en forma activa, insuficiente para inactivar las PBPs. Más complicada es la situación planteada por las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam, con elevada afinidad por el enzima y baja tasa de hidrólisis. En este modelo se genera mayor concentración de E-S inactivo biológicamente, ciertos niveles de sustrato hidrolizado Si, y bajos de sustrato activo, dependientes de la permeabilidad a través de la ME. Compuestos monoaniónicos o dianiónicos, con discreta entrada en la célula, propenden a la resistencia al disponer de pocas moléculas efectivas para saturar un n° considerable de PBPs. De esta forma se puede concebir de manera coherente la resistencia a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e incluso moxalactam. Distanciándose en cierta medida de este comportamiento, los antibióticos zwitteriónicos como cefpiroma con menor afinidad por el enzima y mayor tasa de entrada al interior de la célula, disponen de más moléculas para saturar análogas PBPs y muestran mayor actividad "in vitro" o "un grado menor de resistencia" expresado por valores de CMIs inferiores.

El modelo más satisfactorio desde el punto de vista de la resistencia lo protagonizan los penems y carbapenems. Conjugan elevada afinidad y muy baja tasa de hidrólisis, con buena penetrabilidad a través de la ME. En estas condiciones, la concentración en el espacio periplásmico de imipenem y meropenem es lo suficientemente elevada para saturar su diana esencial, PBP 2, que además está presente en n° inferior a las PBPs 1 y 3 objetivo prioritario del resto de ABL. Bajo estas premisas es perfectamente comprensible su elevada actividad "in vitro" y las diferencias de comportamiento entre este grupo de fármacos y sus competidores habituales, las penicilinas y cefalosporinas.

6.7.3 CEFALOSPORINASAS CONSTITUTIVAS.

Las **Enterobacteriaceae** que no deben su resistencia a β CRI, sintetizan β las expresadas constitutivamente a bajo nivel. El enzima ampC de **E. coli** se ha estudiado ampliamente y es considerada el prototipo, aunque también se han caracterizado enzimas de esta naturaleza en **Shigella**, **Yersinia** y **P. mirabilis**²⁰⁶. Codificada por el gen estructural ampC, tiene como precursor una pre- β la de 377 aminoácidos, con un péptido señal de 19 necesario para la maduración enzimática y para la secreción en el espacio periplásmico^{218,442}. Se trata de enzimas de PM 32.000-39.000 y pI oscilante entre 8.7 y 9.3, que hidrolizan con mayor rapidez la cefaloridina que la penicilina G y son inhibidas por la cloxacilina, I, y Hg²⁺, pero no por el a. clavulánico, sulbactam ni pCMB. Habitualmente, se expresan a bajo nivel constitutivo que no determina resistencia a ABL. La inactivación por mutación del gen ampC en una cepa de **E. coli** inhibida por 2 ug/ml de ampicilina, no ocasiona una disminución apreciable de la CMI⁴⁴². No obstante, mutaciones que afectan al operón β la motivan la síntesis constitutiva de mayores cantidades de enzima, que causan resistencia o pérdida de sensibilidad incluso a las cefalosporinas de 3ª generación y otros nuevos ABL.

El locus β la es conocido como ampC y mapeado a 94' en el cromosoma de **E. coli** K12⁴⁴³. Inicialmente, se descubrió el locus ampA como región regulatoria de la expresión enzimática en mutantes de **E. coli** resistentes a ampicilina⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶. El incremento de la resistencia a ampicilina de 10 a 50 ug/ml, permite hablar de dos niveles con implicaciones mutacionales que afectan al locus ampA y al locus ampB, distante del anterior y hallado con posterioridad⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. El hallazgo del gen estructural ampC es posterior, y después de clonar y secuenciar esta región del ADN se ha demostrado que ampA es una región regulatoria incluida en el locus ampC^{403,448}. Jaurin et al. demuestran en 1981, que la expresión pobre del gen ampC es debida a un promotor ineficaz y a la existencia de una estructura atenuadora, situada entre el gen estructural y el promotor, responsable de la finalización temprana de la transcripción⁴⁰³. Aunque la tasa de crecimiento del microorganismo y el medio de cultivo pueden influir en la prematura terminación de la transcripción, se cree que el solapamiento de los operones ampC y fumarato-reductasa en el cromosoma de **E. coli** y sus funciones recíprocas de ate-

nuación, tienen mayor responsabilidad en la regulación de la síntesis de β la⁴⁴⁹.

La expresión del gen *ampC* es siempre constitutiva no viéndose afectada por fenómenos de inducción. En condiciones normales el gen se expresa pobremente dando lugar a la síntesis de cantidades ínfimas de enzima, inferiores a 0,01% del total de proteína, que condicionan un fenotipo amplio de sensibilidad a ABL. No obstante la hiperproducción enzimática, y por ende la resistencia, pueden producirse por mutaciones diversas que afectan al operón β la. La amplificación del gen *ampC* o repeticiones de fragmentos de ADN que portan el gen *ampC*, provocan el incremento en la producción de enzima^{405,408}. Un efecto equiparable produce la inserción de un par de bases en el promotor, al incrementarse la frecuencia de iniciación de la transcripción⁴⁰³. Diferentes mutaciones en el promotor, ocurridas a baja frecuencia de 10^{-10} , y atenuador, a frecuencia más reseñable 10^{-8} , consiguen elevaciones importantes en la tasa de transcripción de *ampC*. La afectación de la sensibilidad a la ampicilina y las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación es común, siempre que la producción de BCR adquiera unas cotas moderadas. En ocasiones, también se ve comprometida la actividad de otras penicilinas semisintéticas y cefalosporinas de 3ª generación a expensas de una desrepresión enzimática considerable. En este caso parece necesaria la combinación de dos mutaciones que afecten coordinadamente a promotor y atenuador, la cual se da con escasa frecuencia 10^{-18} , explicando la rareza del hallazgo de cepas de *E. coli* con este fenotipo²⁶⁵.

6.7.4 CEFALOSPORINASAS INDUCIBLES.

Muchas bacterias gram-negativas sintetizan BCRI responsables de su resistencia a ABL. Enzimas de esta naturaleza se han caracterizado en *Enterobacter* 266,410,414,416,427,450-455, *Citrobacter* 209,264,266,426,450,451,456,457, *Serratia* 209,264,266,458-460, *Morganella* 266,451,461, *P. rettgeri* 462,463, *Providencia* 463, y *P. aeruginosa* 266,464. Pertenecen a la clase molecular C y muestran elevado grado de homología genética, así como propiedades y características comunes. Su PS, clásico de cefalosporinasa, es similar al de las BCR, aunque son enzimas mucho más eficientes y causan la inactivación de las cefalosporinas

de 3ª generación y el aztreonam de manera más rotunda. El perfil de inhibición también es coincidente y caracterizado por la ausencia de sensibilidad a los inhibidores típicos de las *βP*. Son enzimas con PM que oscila entre 25.000 y 40.000 D, y en sus pIs se observa alguna variación entre los diversos géneros y aún dentro de una misma especie, pero siempre dentro del rango básico.

Como sabemos la expresión del enzima es inducible por ABL y puede ser alterada por mutación, para dar lugar a una forma establemente desreprimida que motiva elevadas concentraciones enzimáticas y resistencia a la mayoría de ABL. Por el momento, el sistema genético responsable tanto de la inducción como de la desrepresión estable no ha sido plenamente dilucidado, aunque los mayores progresos se han efectuado con referencia a *C. freundii* y *E. cloacae* al haber sido clonados los genes que participan en la regulación⁴²³. Se han identificado 4 genes reguladores *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*, que afectan de manera positiva y negativa la expresión del gen estructural *ampC*^{423,424,465}. El gen *ampR*, adyacente al estructural, codifica una proteína que actúa como activador de *ampC*⁴⁶⁶⁻⁴⁷⁰. El segundo gen regulador, *ampD*, situado en una región distante de *ampR* y *ampC*, es responsable del bajo nivel de expresión de *ampC* en cepas salvajes sin inducir. Su inactivación por mutación tiene lugar a elevada frecuencia y determina la producción incrementada de *βla*, regulando negativamente la expresión de *ampC*, aunque no se conoce en que forma interacciona con *ampR*^{467,469,471,472}. De cualquier forma, ambos *ampR* y *ampD* deben estar presentes y funcionantes en los fenotipos inducibles. El gen *ampG*, recientemente caracterizado en un mutante de *E. cloacae* 55, también es necesario para la activación del gen estructural *ampC* por la proteína *AmpR*, toda vez que sin su participación no son factibles ni la inducción ni la producción establemente desreprimida de enzima⁴²³. Probablemente, el producto del gen *ampG* y *AmpD* modulan conjuntamente la capacidad de *AmpR* para activar la expresión de *ampC*. El gen *ampE* es responsable de la síntesis de una proteína de 30Kd, *AmpE*, con posible acción ATPasa, localizada en la membrana citoplásmica. La ausencia de *ampE* en *E. cloacae* disminuye el efecto de inducción⁴⁶⁵. En *C. freundii* y *E. cloacae* el gen *ampC* codifica una pre-*βla* con un péptido señal de 19 aminoácidos y los operones *βla* y fumarato-reductasa no se solapan sino que están separados por la región correspondiente a *ampR*⁴⁵⁷.

A partir de 1963, se han identificado diversas BCR en *E. cloacae* diferenciadas fundamentalmente por su pI. En ese año, Fleming et al. describen el primer mutante desreprimido en la cepa P99⁴⁷³. Algo después, en 1967, Hennessey et al.⁴⁷⁴ demuestran la inducibilidad de *E. cloacae* con penicilina. En 1983, Seeberg et al.⁴⁵⁵ establecen dos subgrupos atendiendo a los valores del pI: en el subgrupo A, pI 8.8 y 8.4, se integran la mayoría de las enzimas identificadas en la especie, mientras que en el B, mucho menos numeroso, se incluyen B_{las} con pI de 7.8 con la enzima P99 como prototipo. Todas las cepas de *P. aeruginosa* sintetizan una BCR_I, que en su estado basal no es causa de resistencia significativa a ABL⁴⁷⁵. Sabath y Abraham⁴⁷⁶ en 1964 y Sabath et al.⁴⁷⁷ un año después, desvelan la inducibilidad del enzima, y describen las características de la B_{la} que pasa a ser conocida como S/A en honor de estos autores. Desde entonces se han identificado más enzimas con PS y PI coincidentes, aunque diferenciadas por el pI. Matthew y Harris estudian 49 cepas que agrupan según su pI: 7.2 (2%), 7.5 (24%), 7.95 (66%) y 8.15 (8%)²⁰². Gates et al.⁴²⁵ trabajando con 70 cepas obtienen una distribución parecida aunque los pIs oscilan entre 8.4, 8.4, 9.2 y 9.6. Las diferencias de pI en 1.2 unidades podrían atribuirse a variaciones metodológicas, o a las múltiples bandas satélites frecuentes en el IEE de esta especie.

Por el momento, al no haberse clonado los genes del operón B_{la} se desconoce su estructura molecular y los mecanismos que regulan su expresión. No obstante, Matsumoto y Terawaki⁴⁷⁸, identifican tres locus posiblemente implicados en el sistema inductivo: B_{laJ} que puede asumir las funciones reguladoras del gen estructural, y B_{laI} y B_{laK} para los que no se ha perfilado misión alguna. También se desconoce si los genes ampR, ampD, ampG, y ampE, identificados en *Enterobacteriaceae*, podrían regular el operón B_{la} en *P. aeruginosa*. Sea como fuere, la expresión enzimática es mínima, aunque la síntesis puede potenciarse después de la inducción con ABL de manera que el enzima pasa a ser una excelente defensa, incluso frente a antibióticos poco hidrolizables^{419,479}. Asimismo, se han estudiado las peculiaridades inherentes a la desrepresión estable y a la selección de mutantes hiperproductores de enzima, obtenidos en el laboratorio o aislados de cepas de origen clínico causantes de fracasos terapéuticos^{215,480-482}. Gates et al.⁴²⁵, tras pasos sucesivos de una cepa de *P. aeruginosa* en medio conteniendo cefotaxima, ais-

lan mutantes parcialmente desreprimidos a una frecuencia de 10^{-7} con pI de 8.4 y 7.5, y mutantes plenamente desreprimidos a mayor frecuencia, 10^{-9} , caracterizados por su pI de 8.4. Todo parece indicar que en *P. aeruginosa* son precisas mutaciones consecutivas para alcanzar la expresión plena del enzima.

6.7.5 OXIIMINOCEFALOSPORINASAS.

Enzimas que inactivan las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación con un grupo oxiimino en su molécula. De nuevo la expresión genética constitutiva o inducible condiciona dos entidades con personalidad propia, que asientan sobre géneros bacterianos distintos. Las oxiiminocefalosporinasas constitutivas son responsables, en cierta medida, de la resistencia a ABL de diversos integrantes del género *Bacteroides*: *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. tethaiotaomicron* 206,386,483,484. Se trata de βlas que por su pI en el rango ácido, 4.6-5.4, por la posibilidad de ser excretadas al medio externo, y por la sensibilidad a la inhibición por a. clavulánico y sulbactam divergen del resto de las βCR.

El segundo grupo, oxiiminocefalosporinasas inducibles, fueron referidas en el pasado como clase Ic por Richmond y Sykes, y también como cefuroximasas, atendiendo a la hidrólisis de este ABL oxiimino sustituido²⁶⁴. Caracterizadas en principio en *P. vulgaris* 206,264,485-488, más tarde se identificaron también en *P. penneri* 489, *P. cepacia* 264,485,490, *P. pseudomallei* 491 y *X. maltophilia* 492,493. Son enzimas de pI básico, cuya clase molecular está por determinar al desconocerse la secuencia en torno al centro activo. Su PS es coincidente con el de las βCRI, no hidrolizando cefamicinas, moxalactam e imipenem, mientras que la sensibilidad a a. clavulánico y sulbactam las acerca más a las oxiiminocefalosporinasas constitutivas. La expresión genética, aunque menos estudiada, parece superponible a la referida con respecto a las βCRI y tanto mediante inducción como por mutación se consigue la desrepresión enzimática y la resistencia a un amplio número de ABL. Su participación en la resistencia, importante por el patrón hidrolítico, está condicionada por su baja incidencia en los microorganismos en que se han caracterizado y por la infrecuencia de los mismos en la patología infecciosa.

6.7.6 PENICILINASAS.

La tantas veces referida clasificación de Richmond y Sykes describía en su Clase II, un conjunto pequeño de enzimas cromosómicas con perfil penicilinasas. Posteriormente, las β las adscritas a este grupo fueron acomodándose en otras parcelas al perfilarse mejor sus propiedades. Incluso la β la de Dalglish identificada en *P. aeruginosa*, fué reidentificada como PSE-4 por Matthew en 1979²⁰³. En síntesis, hoy se considera un grupo exiguo y prácticamente monoenzimático, al que sólo parece pertenecer la β CR identificada en *A. faecalis*⁴⁹⁴.

6.7.7 METALOENZIMAS.

Enzimas de amplio espectro que requieren metales divalentes para ejercer su actividad y que conforman en exclusiva la clase molecular B²⁰⁶. A la enzima de *B. cereus* II, se han añadido la β la L1 de *X. maltophilia*⁴⁹², inducible y responsable de la resistencia a imipenem, aunque no hidroliza moxalactam ni aztreonam, y otras β CR caracterizadas en *F. odoratum*, *L. gormanii* y *B. fragilis*, no inhibidas por a. clavulánico y causa inmediata de amplia resistencia a múltiples ABL. La incidencia reducida de estos microorganismos como causa de infección limita enormemente su repercusión en la resistencia clínica²⁰⁶.

6.7.8 ENZIMAS DE AMPLIO ESPECTRO EN KLEBSIELLA.

De todas las *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella* es el género con mayor número de β P y β CR caracterizadas, lo que da lugar a una proliferación de fenotipos de sensibilidad entre los que es difícil discernir la participación de las diferentes enzimas. La resistencia a ABL en *Klebsiella* es, por tanto, un "microcosmos" en el que la implicación de las β CR no está completamente puntualizada. La codificación compartida por plásmidos, transposones y cromosoma de alguna de las enzimas tampoco contribuye positivamente a ello. En el fenotipo más habitual, singular por la resistencia moderada a penicilinas semisintéticas, la contribución de las β CR parece común.

Se han identificado β CR, similares en sus propiedades, en tres

especies muy relacionadas a nivel bioquímico: *K. aerogenes* 202, 209, 273, 454, 495, *K. pneumoniae* 209, 496, 497 y *K. oxytoca* 498-500. Se trata de enzimas con pI que varía entre 4.9 y 6.8, aunque para algunas se han reportado valores de 7.2 y 7.7, originalmente incluidas por Richmond y Sykes en la clase IV. Son consideradas de amplio espectro, si bien hidrolizan con mayor eficacia penicilinas, circunstancia que queda reflejada en las pruebas de sensibilidad. Alguno de estos enzimas encontrados esporadicamente en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, entre ellas la denominada K1, disponen de mayor perfil hidrolítico que atañe también a oximiinocefalosporinas y aztreonam, excluyendo cefamicinas, ceftazidima, moxalactam e imipenem^{272, 273, 497-500}. Dos de ellas aisladas de *K. aerogenes* 1082 y *K. pneumoniae* Sc10436 se han estudiado a nivel molecular, de manera que la secuencia relacionada con el centro activo permite asignarlas a la clase A^{273, 497}. La heterogeneidad relativa del PS contrasta con la similitud en el PI singularizado por la sensibilidad a la inhibición por pCMB, Hg²⁺, I y a. clavulánico y la resistencia a cloxacilina y EDTA.

6.7.9 BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS: RESISTENCIA Y REPERCUSION CLINICA.

Resistencia "in vitro" y resistencia clínica son dos conceptos próximos pero no completamente coincidentes. La primera es casi siempre necesaria para alcanzar la segunda, mientras que la codificación de mecanismos de resistencia por una bacteria no siempre conlleva falta de respuesta terapéutica. La resistencia clínica que involucra al binomio β la/A β L puede producirse de manera puntual, esporádica y no diseminada, o puede ser frecuente y ampliamente extendida. La magnitud de la misma, no viene condicionada solamente por la habilidad inactivante de un enzima, ni por las posibilidades de obviarla de un A β L, sino que está también en razón directa con la difusión de los genes de resistencia entre la población patógena. Entre las BP "el teatro de operaciones" está bastante bien definido. El enorme espectro hidrolítico de la carbapenemasa plasmídica de *P.aeruginosa*, está ampliamente compensado por su limitada difusión a una especie y a una sola cepa. El espectro mucho más reducido de TEM-1, también está compensado, en sentido opuesto, por su difusión universal a múltiples microorganismos usualmente encontrados en todos los lugares del mundo.

Entre las BCR el boceto es algo distinto desde el momento en que todos los microorganismos gram-negativos sintetizan una enzima específica de especie. Por tanto, la diseminación del enzima tiene menos relevancia en favor del tipo de enzima, de la forma de expresión genética, y de la incidencia de aislamiento en cada ambiente de los microorganismos que codifican las enzimas con mayor capacidad inactivante. Para completar una visión global de la trascendencia de las BCR en la resistencia, hay que estimar las pautas epidemiológicas en el control de la infección nosocomial y la utilización de antimicrobianos en cada hospital.

El tipo de enzima y su expresión constitutiva o inducible son esenciales para delimitar el alcance de la resistencia. Aquellos microorganismos con producción constitutiva ofrecen menos oportunidades de generar resistencia. *E. coli*, *P. mirabilis* y *Shigella* sintetizan constitutivamente mínimas cantidades de β la insuficientes para proteger a la bacteria de la acción inhibidora, incluso de ABL con marcada tasa de hidrólisis como ampicilina y cefalosporinas de 1ª generación^{209,211,265}. La mutación genética que permite la síntesis de β la de forma desreprimida está bien documentada en *E. coli* y es más incierta en *Shigella* y *P. mirabilis*. No obstante la tasa de mutación es muy baja, 10^{-10} , y la posibilidad de selección de mutantes hiperproductores es limitada por no coexistir dentro de la misma población ambas formas celulares. En consecuencia la resistencia amplia a múltiples ABL, aunque constatada, es muy infrecuente con cifras de incidencia para *E. coli* que oscilan en torno al 1%.

La situación es diametralmente distinta en aquellas especies, *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *Morganella*, *Serratia spp* y *P. aeruginosa* en las que la síntesis enzimática es inducible y puede alcanzarse la desrepresión estable por mutación^{115,261,265,268}. La coexistencia dentro de la misma población de células inducibles y mutantes constitutivamente hiperproductores de β la en una tasa de 10^{-6} , facilita la selección de estos últimos cuya producción enzimática llega al 4% del total de proteína, y la dominancia de la resistencia a la mayoría de ABL. Aún dentro de estas especies el comportamiento de cada binomio β la/ABL no es uniforme y de hecho difiere en función de las propiedades hidrolíticas de cada enzima y de las características de cada

ABL. Livermore, en un trabajo que consideramos excepcional y definitivo en el esclarecimiento del problema, analiza la interrelación β la/ABL diferenciando cuatro situaciones basadas en el poder inductor de cada antibiótico y en su sensibilidad a la inactivación enzimática²⁶⁹. La tabla 10 resume los resultados "in vitro" de esta interrelación, considerando tres niveles de producción enzimática: basal, inducible y establemente desreprimida.

En el primer esquema se analizan aquellos ABL, penicilina G, ampicilina y cefalosporinas de 1ª generación, considerados inductores potentes de β la pero a su vez lábiles a la acción del enzima. El resultado de la interacción no puede ser otro que la hidrólisis del antibiótico y la resistencia, con valores elevados de CMI para todas las especies correctamente detectados por los ensayos rutinarios. La selección de mutantes desreprimidos sería conceptualmente posible, aunque la elevada concentración de β la motivada por la inducción protege a la bacteria en forma análoga a la sintetizada por los mutantes. No obstante, en aquellas cepas de *E. cloacae* moderadamente sensibles a ampicilina se ha demostrado selección de cepas establemente desreprimidas³⁹⁴. En este contexto, la situación referente a cefoxitina y probablemente al resto de cefamicinas es singular. Esta cefamicina es un potente y lábil inductor en *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. aeruginosa*, mientras que es potente inductor pero estable de la β la de *Morganella*, *Proteus* y *Serratia* ^{267, 268}. Los resultados de las pruebas de sensibilidad ratifican con precisión esta divergencia de comportamiento.

Más complicada y desde luego apasionante es la situación creada por carbenicilina, ureidopenicilinas, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación y aztreonam. Estos antimicrobianos son débiles inductores de β la y sensibles a la acción hidrolítica del enzima, aún producido a bajo nivel. Con estas premisas el grado de labilidad varía en función de cada antimicrobiano y de las distintas β las de cada especie, perfilandose pautas de comportamiento diferentes no siempre detectadas con precisión por los tests de sensibilidad "in vitro". En situación basal, con producción exigua de β CRI los antimicrobianos son activos. Ahora bien, dada la débil inducción el antibiograma convencional no detecta las posibilidad de inactivación, que sólo se contemplará si se ha producido previamente la inducción por inductores potentes o la selección de mutantes desreprimidos.

TABLA 10.- BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS INDUCIBLES Y SENSIBILIDAD A BETALACTAMICOS.

Bacteria	βla	CMI en ug/ml							
		AMP**	CAR	PIP	TEM	FOX	TAX	CAZ	IMP
E. cloacae	B*	2-16	4-16	1-4	2-4	2-8	0,06-0,2	0,1-0,5	0,06-0,2
	I	256-1024	4-16	1-4	2-4	256-512	0,06-0,2	0,1-0,5	0,2-1
	EDR	256-1024	64-256	128-512	4-8	256-512	64-512	64-128	0,2-1
M. morgani	B	4	1-2	0,1	2-4	4-8	≤0,01	0,03	ND
	I	512	1-2	0,2	2-4	4-8	≤0,01	0,06	0,5-4
	EDR	512-2048	8	32-64	2-4	4-8	4	8	0,5-4
P. vulgaris	B		0,5-1	2	1-4	4-8	≤0,01	0,05	ND
	I		0,5-1	2	1-4	4-8	0,03	0,03	2-8
	EDR		32-64	16	1-4	4-8	2	0,2	2-8
S. marcescens	B		ND	0,5		4-8	0,06	0,03	ND
	I		8-16	4		4-8	0,5	0,1	0,5-2
	EDR		128	32		4-8	4	0,5	0,5-2
P. aeruginosa	B	4-32	32-128	2-16		16-64	4-32	0,5-2	0,2-0,5
	I	>128	32-128	2-16		256-512	4-32	0,5-2	2-4
	EDR	>128	64-256	128-1024		256-512	256-1024	8-32	2-4

* B: Basal, I: Inducible, EDR: Establemente desreprimida.

** AMP: Ampicilina, CAR: Carbenicilina, PIP: Piperacilina, TEM: Temocilina

FOX: Cefoxitina, TAX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, IMP: Imipenem.

Datos tomados de la referencia 269.

De estas consideraciones se infieren con claridad dos modelos de actuación diferentes. En situación basal e incluso cuando la inducción no es prolongada la eficacia antimicrobiana se manifiesta tanto "in vitro" como "in vivo". Bien distinto es el prisma real cuando ha tenido lugar la selección previa de mutantes resistentes, tanto en el laboratorio como en la clínica. Carbenicilina tiene un patrón dual al considerarse débil inductor y lábil frente a la BCRI de *E. cloacae* y *C. freundii*, pero estable y también de escasa capacidad de inducción con relación a *Morganella* y *P. aeruginosa*. Sus opciones terapéuticas son divergentes en función del microorganismo causante de la infección. Las ureidopenicilinas se muestran uniformemente resistentes, con CMIs mayores de 64 ug/ml, frente a todas las especies con β las establemente desreprimidas. Cefotaxima, ceftizoxima y ceftriaxona son inactivas, con CMIs superiores a 256 ug/ml frente a *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. aeruginosa* hiperproductoras de enzima, pero parecen activas a concentraciones clínicamente alcanzables, frente a cepas desreprimidas de *Proteus*, *Morganella* y *Serratia*. Ceftazidima y cefpiroma, en función de la tasa de hidrólisis, afinidad y penetración al interior de la célula, son menos sensibles a la inactivación enzimática y con frecuencia muestran valores de CMI inferiores (rango de 4-32 ug/ml), en relación con *Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia* y *P. aeruginosa* 267, 268, 421.

La selección de mutantes establemente desreprimidos en su producción enzimática, es el verdadero "caballo de batalla" de los antimicrobianos incluidos en este grupo, a la vez que un problema clínico de dimensiones considerables. La inestabilidad a las BCRI no es sustantiva cuando el nivel de producción es bajo y en estas condiciones la eficacia terapéutica está más preservada. Ahora bien, en tratamientos prolongados o cuando el inóculo bacteriano es denso tienen lugar tres acontecimientos en cierta forma consecutivos: a) las células "normales", escasamente productoras de BCRI aún después del contacto con el antibiótico, son eliminadas por acción del ASL; b) se produce la selección de los mutantes resistentes que contiene la población, por la incapacidad de respuesta del antimicrobiano a la elevada concentración de enzima originada por la desrepresión; c) estos mutantes se hacen dominantes entre la población y motivan la resistencia. Por tanto, "la supervivencia del más fuerte" determina resistencia "in vitro" y fracaso terapéutico

bien documentado en la literatura respecto de: piperacilina³⁹³, azlocilina⁵⁰¹, cefamandol^{124,266,502,503}, cefotaxima²⁶⁹, ceftizoxima⁵⁰⁴, ceftriaxona⁵⁰⁵, ceftazidima^{421,481,506,507}, y moxalactam⁵⁰⁸. Este mecanismo representa la causa más común de resistencia a nuevos ABL, con la excepción de imipenem, y parece más usual en *E. cloacae* y *P. aeruginosa* que en el resto de gram-negativos con BCRI.

La magnitud real del problema es una cuestión no fácil que está por cuantificar. Cualitativamente sabemos que el paciente recidiva o no responde a la terapia antimicrobiana. Los cultivos post-tratamiento denotan el aislamiento de cepas resistentes, cuando en el inicio se mostraban sensibles. Se ha argumentado, como resultado del análisis diario de resultados y también con datos experimentales obtenidos de ensayos clínicos con nuevos ABL, que entre 10 y 50% de las infecciones graves por *Enterobacter*, *Citrobacter* o *P. aeruginosa* fracasan por la selección de mutantes resistentes. En el futuro parece necesario acercarse con fiabilidad a las cifras reales y hacer patente la importancia de la diseminación nosocomial de estas cepas. Entretanto, es de suma importancia efectuar una reflexión analítica, antes de instaurar el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.

El tercer grupo de ABL diferenciado por Livermore está formado por compuestos considerados inductores potentes, pero resistentes a la inactivación por el enzima inducido. Constituyen una opción terapéutica favorable, siempre que se utilicen de forma individualizada y no en asociación con otros lábiles que conducirá al antagonismo. Cefoxitina, en *Proteus*, *Morganella* y *Serratia* induce la síntesis de BCRI pero es igualmente activa frente a cepas con producción basal ó desreprimida (CMI 4-8 ug/ml)²⁶⁷. Imipenem y meropenem también se consideran inductores potentes y estables. A pesar de su elevada afinidad y muy lenta hidrólisis por las BCRI de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* los carbapenems muestra idéntica actividad frente a cepas basales, inducidas o establemente desreprimidas, lo que dificulta extraordinariamente la selección de mutantes desreprimidos. De hecho Kirkpatrick et al.⁵⁰⁴ reconocen la imposibilidad de seleccionar con imipenem mutantes desreprimidos de *E. cloacae*, *M. morganii* y *S. marcescens*. Los mutantes de *P. aeruginosa* seleccionados en el laboratorio y también después del tratamiento con imipenem,

son resistentes por la ausencia de una proteína de membrana que provoca disminución de la permeabilidad de la ME. Indudablemente los carbapenems utilizados con cautela son una alternativa excelente en el tratamiento de infecciones graves por microorganismos que hiperproducen β CRI.

Queda una última opción por considerar, la más favorable pero la menos provista de ABL. Se trata de antimicrobianos, casi ideales, con escaso poder de inducción de β CRI y resistentes a su inactivación. En esta situación el enzima producido a bajo nivel, que no se incrementa apenas por inducción, es incapaz de proteger a la bacteria incluso en el caso de mutantes desreprimidos. La eliminación de estas de forma análoga a las células inducibles imposibilita la selección. Carbenicilina se aproxima a esta posición envidiable, pero sólo en el caso de *P. aeruginosa* y *Morganella* mientras que se considera lábil aunque débil inductor en aislamientos de *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. vulgaris*. Temocilina, la única metoxipenicilina, tiene la condición de inductor débil y estable en *E. cloacae* y *Proteus spp* y es una opción a considerar. Esta línea de búsqueda de débiles inductores estables a las β CRI, podría ser una de las idóneas en la resolución de una cuestión crucial en la terapia antimicrobiana.

II.- MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS.

Todos los microorganismos incluidos en este estudio se obtuvieron de muestras clínicas de pacientes atendidos, y en su mayoría ingresados, en el Hospital Ramón y Cajal, un centro con 1.250 camas de hospitalización que atiende a una población de 600.000 personas, y que como hospital de referencia recibe enfermos de todo el país.

En el estudio general de la sensibilidad a ABL se incluyen 20.988 aislamientos de **Enterobacteriaceae** y 4.579 de **Pseudomonas aeruginosa**, obtenidos durante un periodo de 10 años comprendido entre el 1 de Junio de 1977 y el 31 de Diciembre de 1986. La distribución de aislamientos por especies bacterianas es como sigue:

Escherichia coli	7.893	Proteus vulgaris	338
Salmonella spp.	2.164	Enterobacter spp.	1.617
Shigella spp.	401	Citrobacter freundii	469
Proteus mirabilis	2.473	Morganella morganii	695
Klebsiella spp.	2.597	Serratia marcescens	2.290
Yersinia enterocolitica	103	Pseudomonas aeruginosa	4.579

La distribución de los aislamientos en función de las muestras clínicas de procedencia es:

<u>Muestra clínica</u>	<u>Enterobacteriaceae</u>	<u>P. aeruginosa</u>
Hemocultivos	2.627 (12,5%)	270 (5,9%)
Urocultivos	10.899 (51,9%)	2.347 (51,2%)
Coprocultivos	2.282 (10,9%)	---
Exudados respiratorios	5.180 (24,7%)	1.962 (42,9%)
Exudados quirúrgicos		
Líquidos orgánicos		

Los aislamientos de coprocultivos corresponden, exclusivamente, a **Salmonella** (1.784 aislados), **Shigella** (401 aislados) y **Yersinia** (97 aislados), y en un 73,6% fueron obtenidos de pacientes atendidos en régimen ambulatorio.

Para el estudio de diferenciación de puntos críticos de sensibilidad a ABL, se incluyeron, además de los anteriores, 800 aislados con valores de sensibilidad inferiores y superiores a los puntos críticos considerados en el estudio general de sensibilidad. Estos aislamientos, también procedentes de muestras clínicas, incluyen microorganismos estudiados en el apartado anterior y otros obtenidos durante los años 1987 a 1989, todos ellos almacenados en leche descremada al 12,5% a -40°C hasta el momento de la determinación de su perfil de sensibilidad. Su distribución es:

<i>Escherichia coli</i>	100	<i>Proteus vulgaris</i>	20
<i>Salmonella spp.</i>	100	<i>Enterobacter spp.</i>	100
<i>Shigella spp.</i>	20	<i>Citrobacter freundii</i>	20
<i>Proteus mirabilis</i>	100	<i>Morganella morganii</i>	20
<i>Klebsiella spp.</i>	100	<i>Serratia marcescens</i>	100
<i>Yersinia enterocolitica</i>	20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100

El estudio de la interrelación entre la producción de β la y los fenotipos de sensibilidad se realizó con 50 cepas de *E. coli* - con distinto grado de sensibilidad a ampicilina, e incluye: 30 cepas productoras de β la TEM-1, 10 cepas productoras de β la OXA-1, y 10 cepas con diferente nivel de producción de β la cromosómica, todas ellas aisladas de muestras clínicas de pacientes atendidos en nuestro hospital. Además se incluyó una cepa de *E. coli*, que codificaba TEM-1 e hiperproductora de β la cromosómica, procedente de un paciente ingresado en The Miriam Hospital, Brown University, Providence RI, USA.

La identificación bioquímica de todos los aislamientos se realizó mediante una batería de pruebas estandarizada según criterios bien establecidos⁵¹⁰⁻⁵¹³. Aquellos microorganismos que plantearon algún problema concreto respecto de alguno de los tests anteriores, fueron definitivamente identificados con las pruebas bioquímicas incluidas en los sistemas de identificación API 20E para *Enterobacteriaceae*, y API 20NE para *P. aeruginosa*.

Como control de los estudios de sensibilidad se utilizaron cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) que incluían: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para la realización del test de Masuda²²⁸ se empleó como

cepa indicadora *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Los estudios de caracterización de β las en *E. coli* fueron realizados utilizando como prototipos en el IEE las cepas siguientes: *E. coli* J53 (R6K) (TEM-1), *E. coli* 1725E (RP1) (TEM-2), *E. coli* J53 (R1010) (SHV-1), *E. coli* 1527E (RGN 238) (OXA-1), *E. coli* 1573E (R1818) (OXA-2), y *E. coli* 1894E (R57b) (OXA-3). Estas últimas cepas nos fueron proporcionadas por A. Medeiros MD, The Miriam Hospital, Brown University, Providence RI, USA.

2. ANTIMICROBIANOS.

Para los tests de sensibilidad realizados mediante la técnica de difusión con disco, hemos utilizado discos de la marca registrada Oxoid, salvo excepciones señaladas, almacenados a 4°C hasta su utilización con la salvedad de los discos de inhibidores de β la y carbapenems que eran mantenidos a -20°C. Las cargas de antimicrobiano en μ g de cada uno de los discos era: ampicilina 10, amoxicilina 25, carbenicilina 100, ticarcilina 75, piperacilina 100, mezlocilina 75, azlocilina 75, temocilina 30, mecilinan 25, cefalotina 30, cefazolina 30, cefamandol 30, cefuroxima 30, cefoperazona 30, ceftioxitina 30, cefotetan 30 (BBL), cefotaxima 30, ceftriaxona 30, ceftizoxima 30, ceftazidima 30, cefpiroma 30 elaborados por nosotros, moxalactam 30, aztreonam 30, imipenem 10 y meropenem 10 (Mast).

Para los estudios de sensibilidad por dilución en agar, referidos tanto al estudio general de sensibilidad realizado a diario durante 10 años, como al resto de ensayos, hemos utilizado los siguientes antimicrobianos en forma de polvo valorado con expresión de su actividad, suministrados de manera gratuita por los laboratorios preparadores (): ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, temocilina, ácido clavulánico, cefminox y ceftizoxima (Beecham y SKB); azlocilina y mezlocilina (Bayer), piperacilina y tazobactam (Lederle), sulbactam y cefoperazona (Pfizer), cefalotina, cefazolina, cefamandol y moxalactam (Eli Lilly), cefuroxima, ceftazidima y nitrocefin (Glaxo), ceftioxitina e imipenem (Merck Sharp Dohme), cefotaxima y cefpiroma (Hoechst), ceftriaxona y carumonam (Roche), aztreonam (Squibb), y cefotetan y meropenem (ICI Farma). Todas estas sustancias valoradas eran mantenidas a 4°C hasta su fecha de caducidad, con la excepción de los inhibidores de β la y los carbapenems almacenados a -20°C hasta su utilización.

3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

3.1 METODO DE DIFUSION CON DISCO.

Hemos utilizado esta técnica como paso inicial en muchas de las determinaciones, y más concretamente en la caracterización de fenotipos de resistencia en *E. coli*, y su correspondencia con la producción de diferentes niveles de β la. El método seguido es el inicialmente preconizado por Bauer, Kirby, Sherris y Turck²⁷ en 1966, con las modificaciones establecidas posteriormente por el NCCLS en los años 1975⁵¹⁴, 1979⁵¹⁵, 1984⁵¹⁶ y 1990⁵¹⁷.

Hemos empleado como medio de cultivo agar Mueller-Hinton de Oxoid en placas con 20 ml de medio, 4 mm de profundidad, y pH de 7,2-7,4. El inóculo bacteriano se preparaba a expensas de un cultivo de 18 horas en agar-sangre, del que se tomaban 4-5 colonias diferenciadas con las que se inoculaba un tubo con 5 ml de solución salina tratando de igualar la turbidez del tubo nº 0,5 de la escala de McFarland. A partir de él, se impregna una torunda estéril con la suspensión bacteriana y tras suprimir el exceso de suspensión rotando la torunda contra las paredes del tubo, se siembra cada placa extendiendo el inóculo en tres direcciones. Para cada aislamiento se utilizaban 4-5 placas en las que se disponían, por medio de un dispensador, 6 discos por placa. Después de 18 horas de incubación a 35°C, se efectuaba la lectura de los halos de inhibición y su interpretación de acuerdo con las categorías establecidas por los métodos de referencia. En todas las series realizadas cada día se utilizaron como control interno del método: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.2 METODO DE DILUCION EN AGAR.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por este método, ha sido la técnica más asiduamente utilizada en los distintos apartados que constituyen el trabajo experimental. La hemos utilizado durante 10 años de manera diaria para conocer la sensibilidad a los ABL y su evolución, así como para la diferenciación de puntos críticos de sensibilidad/resistencia, y en el estudio de correlación entre producción de

diferentes niveles de β la y sensibilidad a ABL. En todos los casos hemos seguido la técnica inicialmente estandarizada por Ericcson y Sherris en 1971²⁸, con las modificaciones posteriores de Washington y Barry⁵¹⁷ (1974), y Washington y Sutter⁵¹⁸ (1980), así como las sucesivas propuestas del NCCLS de 1985⁵¹⁹ y 1990³⁴.

Como medio de cultivo, siempre empleamos agar Mueller-Hinton de Oxoid con pH de 7,2-7,4, en el que se interponían diferentes concentraciones de antibióticos en diluciones progresivas en base 2. Las concentraciones de antimicrobianos utilizadas en cada caso y la forma de preparación de las placas varió en función de los propósitos a conseguir:

a) En el estudio de la sensibilidad realizado diariamente durante 10 años, empleamos concentraciones críticas de sensibilidad para cada antibiótico alcanzadas en el agar a expensas de soluciones madre de antibiótico, añadidas a 18 ml de medio en un volumen de 2 ml, y preparadas extemporáneamente con polvo valorado de cada uno de los ABL. Las concentraciones críticas de cada antibiótico, la concentración mayor de que partíamos, y los diferentes solventes y diluyentes eran:

Ampicilina: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8 y 16 ug/ml.
Concentración madre de 1,6 mg/ml x factor.
Solvente, buffer fosfato pH 6.0 0,1 M.
Diluyente, buffer fosfato pH 6.0 0,1 M.

Carbenicilina. Concentraciones críticas de 64, 128 y 256 ug/ml.
Concentración madre de 25,6 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente agua destilada estéril.

Cefazolina: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.

Cefamandol: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.

-
- Cefoxitina: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.
- Cefamandol: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.
- Cefoxitina: Cc. críticas de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.
- Cefotaxima: Cc. críticas de 0,1, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.
- Ceftazidima: Cc. críticas de 0,1, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente, solución de carbonato sódico al 10%.
Diluyente, agua destilada estéril.
- Aztreonam: Cc. críticas de 0,1, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente, sol. saturada de bicarbonato sódico.
Diluyente, agua destilada estéril.
- Moxalactam: Cc. críticas de 0,1, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 ug/ml.
Concentración madre de 3,2 mg/ml x factor.
Solvente y diluyente, agua destilada estéril.

Con estas especificaciones, las placas eran preparadas cada semana y mantenidas a 4⁰C hasta su utilización, sin pérdida aparente de la actividad de los antimicrobianos como pusieron de manifiesto los controles diarios realizados con cepas de sensibilidad conocida.

b) En los ensayos llevados a cabo para la diferenciación de los puntos críticos de sensibilidad/resistencia para cada antimicrobiano en relación con cada especie bacteriana, ampliamos el rango de concentraciones en los límites inferior y superior de cada una de las críticas establecidas en el apartado anterior con el siguiente esquema.

<u>Ampicilina:</u>	Concentración inferior 0,1 ug/ml. Concentración superior 256 ug/ml.
<u>Carbenicilina.</u>	Concentración inferior 1 ug/ml. Concentración superior 1024 ug/ml.
<u>Cefazolina:</u>	Concentración inferior 0,1 ug/ml. Concentración superior 256 ug/ml.
<u>Cefamandol:</u>	Concentración inferior 0,1 ug/ml. Concentración superior 256 ug/ml.
<u>Cefoxitina:</u>	Concentración inferior 0,1 ug/ml. Concentración superior 256 ug/ml.
<u>Cefotaxima:</u>	Concentración inferior 0,007 ug/ml. Concentración superior 64 ug/ml.
<u>Ceftazidima:</u>	Concentración inferior 0,007 ug/ml. Concentración superior 64 ug/ml.
<u>Aztreonam:</u>	Concentración inferior 0,007 ug/ml. Concentración superior 64 ug/ml.
<u>Moxalactam:</u>	Concentración inferior 0,007 ug/ml. Concentración superior 64 ug/ml.

c) En el estudio de correlación entre la producción de β la y la sensibilidad a ABL en *E. coli*, el rango de concentraciones estudiado fue: para las penicilinas 1-1024 ug/ml; y para las cefalosporinas, monobactams y carbapenems 0,01-512 ug/ml.

El inóculo bacteriano se preparó de forma similar para todos los ensayos. Partiendo de un cultivo en agar sangre de 18 horas, se toman 4 ó 5 colonias de la misma morfología del microorganismo a estudiar y se inoculan en tubos conteniendo 5 ml de caldo Mueller-Hinton. Después de 2-3 horas de incubación a 35°C, los tubos se agitan y la densidad del cultivo se ajusta a la del nº 0,5 de la escala de McFarland. Posteriormente, esta suspensión se diluye 1/10 en solución salina hasta alcanzar la concentración de inóculo deseada de 10^7 UFC/ml. El paso siguiente supone el llenado de los 32 pocillos del replicador de-

Steers, para lo cual de cada tubo con el inóculo ajustado se toma una alícuota y se introduce con pipeta en el pocillo, inoculando después cada una de las placas con 1 ó 2 ul de inóculo, el inóculo final es aproximadamente de 10^4 UFC por depósito.

Transcurridos 15 minutos de la inoculación, las placas se incuban invertidas 18 horas a 35°C en atmósfera de aire, y después de comprobar que la sensibilidad de las cepas patrón está dentro de los límites establecidos, se determina la CMI para cada microorganismo y antibiótico, como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento, ó permite el desarrollo de no más de 3-5 colonias del microorganismo. En todos los ensayos se incluyeron como control de la actividad antimicrobiana: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

4. ESTIMACION MATEMATICA DE LOS PUNTOS CRITICOS DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA.

El estudio general de sensibilidad a los ABL realizado de forma consecutiva y diaria durante 10 años sobre un total de 20.988 aislamientos de *Enterobacteriaceae* y 4.579 de *P. aeruginosa*, y la ampliación efectuada sobre 800 aislamientos más, considerando concentraciones inferiores y superiores a los concentraciones críticas ensayadas en el apartado anterior, nos han proporcionado un importante número de valores de CMI con los que confeccionar una amplia base de datos informatizada mediante un paquete estadístico comercializado para ordenadores personales IBM y compatibles.

Con esta base de datos y la aplicación de un modelo matemático $520,521$, pretendemos diferenciar la existencia de distintos tipos de poblaciones para cada especie bacteriana en relación con cada uno de los ABL estudiados, y en esencia la distinción de puntos críticos de sensibilidad y resistencia microbiológica (PCSM y PCRM), que facilitarían la discriminación entre los integrantes de la población sensible, y los pertenecientes a "otra población" denominada menos sensible o resistente.

El modelo matemático exige, para cada binomio bacteria-antibiótico, la definición de una variable independiente, que en nues-

tro caso sería cada una de las concentraciones de antimicrobiano ensayadas, y la búsqueda de una variable dependiente obtenida experimentalmente, que en nuestro modelo vendría dada por el porcentaje de inhibición a cada una de las concentraciones. La respuesta es, por tanto, un diagrama de dispersión que debe ajustarse a un modelo-fórmula matemático. La representación gráfica de estos valores en un eje de coordenadas, llevando a abscisas los valores de cada concentración, o en realidad una transformación matemática de ellos, y al eje de ordenadas los porcentajes de sensibilidad a cada concentración, da lugar a un diagrama de puntos que sugiere en cada caso una función matemática distinta que se ajusta a a cada figura.

El cálculo de la función matemática para cada representación gráfica se realizó por el procedimiento de regresión de los mínimos cuadrados, obteniéndose tres modelos distintos en función del diagrama gráfico:

a) Polinomio de 3º. Determinado cuando el aspecto gráfico que sugieren los puntos obtenidos experimentalmente, muestra un crecimiento del porcentaje de aislamientos inhibidos hasta alcanzar un máximo en la medida que se incrementa la concentración de antimicrobiano, para después decrecer hasta un valor mínimo próximo al eje de abscisas. En este modelo queda una segunda distribución de aislamientos inhibidos a concentraciones mayores, que delimita una segunda población claramente diferenciada de la anterior. El procedimiento de ajuste nos proporciona los valores de las constantes que llevan a la ecuación específica - $y=ax^3+bx^2+cx+d$ - en las que a, b, c y d son las constantes que para cada caso particular tomarán unos valores numéricos concretos.

b) Polinomio de 2º. Determinado cuando el aspecto gráfico que sugieren los puntos obtenidos experimentalmente, muestra un crecimiento del porcentaje de aislamientos inhibidos hasta alcanzar un máximo en la medida que se incrementa la concentración de antimicrobiano, para después decrecer hasta un valor mínimo ó 0 en el eje de abscisas. En este modelo no existe una segunda distribución de aislamientos inhibidos a concentraciones mayores. El procedimiento de ajuste nos proporciona los valores de las constantes que llevan a la ecuación específica - $y=ax^2+bx+cx$ - en las que a, b, y c son las constantes que para

cada caso particular tomarán unos valores numéricos concretos.

c) Ecuación exponencial. Determinada cuando el aspecto gráfico que sugieren los puntos obtenidos experimentalmente, muestra un crecimiento del porcentaje de aislamientos inhibidos hasta alcanzar un máximo en la la concentración más alta de las ensayadas. Obviamente, en este modelo no existe un posterior decrecimiento, que sería alcanzado de continuar incrementando las concentraciones superiores a estudiar, hasta conducirnos a alguno de los dos modelos anteriores. Por ello, este modelo es más insatisfactorio en la definición de puntos críticos. De igual manera, el procedimiento de ajuste proporciona los valores de las constantes que llevan a la ecuación específica - $y = ae^{bx}$ -.

Obtenidas en cada situación práctica las funciones matemáticas representativas de cada diagrama, el paso siguiente se basa en la obtención de los puntos críticos correspondientes a las CMI que delimitarían el máximo de la función, que tomaremos como punto crítico de sensibilidad microbiológica (PCSM), el punto de inflexión de la curva, y la abscisa correspondiente al 95% de inhibición tomada empíricamente como punto crítico de resistencia microbiológica (PCRM) o valor diferencial entre poblaciones diferentes.

En el caso del polinomio de 3º asumimos que la primera población, la teórica población sensible, se encuentra entre el origen y el mínimo de la función, de manera que la población restante definida a partir de ese punto mínimo en abscisas sería diferente. Asignando un área unidad o de 100% a la comprendida bajo la curva dibujada entre esos límites origen y mínimo de la función, podemos determinar mediante un procedimiento matemático de integrales definidas: la concentración de cada antimicrobiano que corresponde al máximo de la función (PCSM), la que corresponde al punto de inflexión, y la correspondiente a un área del 95% (PCRM) elegida por nosotros como diferenciadora entre dos poblaciones. Estas concentraciones obtenidas de la aplicación de la función matemática no serán valores de CMI equivalentes a los habitualmente utilizados en el modelo experimental, pero su adscripción a la CMI más próxima de las utilizadas en base 2 nos dará para cada binomio bacteria-antibiótico los puntos críticos buscados. La esencia matemática de los mo-

de los representados por el polinomio de 2º y la ecuación exponencial creciente, impide la obtención del punto de inflexión. No obstante, ambos modelos hacen factible mediante la integración, de manera análoga al polinomio de 3º, la obtención de la abscisa máxima y la correspondiente al 95% del área que de forma similar se adscriben a los puntos críticos de sensibilidad y resistencia microbiológica.

El procedimiento seguido es matemáticamente complejo, y ha sido necesaria la realización de una aplicación informática especial para poder establecer estos valores críticos de CMI de la manera que parece científicamente más correcta.

5. DIFERENCIACION DE FENOTIPOS DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

El análisis del comportamiento de cada especie bacteriana en relación con cada uno de los ABL ensayados, e incluso la evolución de la sensibilidad y resistencia, se benefician de la diferenciación de fenotipos de sensibilidad-resistencia, que además permitirían vislumbrar la presencia de mecanismos de resistencia poco usuales o incluso no identificados.

En este sentido, la exclusiva y habitual distinción de fenotipos en base a parámetros farmacocinéticos supone una visión parcial, o mejor incompleta del problema. Por ello entendemos positivo discriminar entre "fenotipos de comportamiento microbiológico" establecidos con arreglo al denominado punto crítico de resistencia microbiológica (PCRM), y "fenotipos clínicos" basados en las concentraciones máximas o submúltiplos de ellas, punto crítico farmacocinético (PCF), que se alcanzan en el suero de los pacientes después de la administración terapéutica de dosis estandar. Mientras que los primeros varían para cada ABL al considerar las diferentes especies de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, los segundos son idénticos para cada microorganismo y varían con cada ABL.

Los PCRM, en valores de CMI en ug/ml, considerados para cada especie/antibiótico son:

<u>Microorganismo</u>	<u>AMP</u>	<u>CAR</u>	<u>CFZ</u>	<u>CFM</u>	<u>FOX</u>	<u>TAX</u>	<u>CAZ</u>	<u>AZT</u>	<u>MOX</u>
<i>E. coli</i>	8	32	16	16	8	0,2	0,5	0,2	0,5
<i>Salmonella spp.</i>	8	32	8	4	8	0,5	1	0,5	0,5
<i>Shigella spp.</i>	4	32	8	8	8	0,2	0,5	0,2	0,2
<i>P. mirabilis</i>	4	128	32	16	16	0,2	0,5	0,2	0,5
<i>Klebsiella spp.</i>	16	64	16	16	16	0,2	1	0,5	1
<i>Y. enterocolitica</i>	64	256	64	16	8	0,2	0,5	0,5	0,5
<i>P. vulgaris</i>	2	32	4	4	16	0,2	0,5	0,2	0,5
<i>Enterobacter spp.</i>	32	64	4	16	8	2	2	1	2
<i>C. freundii</i>	64	64	-	16	4	2	2	2	1
<i>M. morganii</i>	32	16	-	32	32	0,5	1	0,2	0,5
<i>S. marcescens</i>	-	64	-	-	128	8	2	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	-	256	-	-	-	64	16	32	64

Los PCF, en ug/ml, tomados en función de distintos parámetros farmacocinéticos^{522,523}, para todas las especies y cada antimicrobiano son:

Ampicilina	8	Cefamandol	16	Ceftazidima	16
Carbenicilina	64	Cefoxitina	16	Aztreonam	16
Cefazolina	16	Cefotaxima	16	Moxalactam	16

6.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

El análisis evolutivo de la sensibilidad a ABL durante 10 años, 1977-1986, se ha realizado construyendo un fichero de datos con los porcentajes acumulativos de sensibilidad para cada especie bacteriana, considerando 2 concentraciones índice de al menos 3 antimicrobianos representativos para cada especie, en todo el periodo de 10 años estudiado. La aplicación estadística de estos datos permite determinar: el coeficiente de correlación lineal de Pearson, la ecuación lineal correspondiente, y el intervalo de confianza al 95% para el valor medio de la sensibilidad global durante 10 años^{520,521}.

El procedimiento estadístico aplicado para determinar la existencia de una tendencia lineal de la evolución, consiste en calcular el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) y la ecuación de regresión lineal correspondiente - $y=a+bx$ -,

siempre que dicho coeficiente sea significativo. El valor de r indica la cuantía de la relación que puede oscilar entre 0 y 1, y el signo de r el sentido de dicha relación. En el caso de valores de r positivos, entenderemos un aumento de la sensibilidad de la especie considerada al antimicrobiano a lo largo del tiempo, mientras que valores negativos del coeficiente de correlación lineal pondrán de manifiesto una tendencia hacia la resistencia. La significación de r está en función del número de puntos utilizados para cada binomio bacteria-antibiótico. Dado que este número es de 10 en el mejor de los casos, la significación estadística, p 0,05, sólo sería relevante para valores de $r \pm 0,632$. No obstante, el valor de r empieza a tener cierta significación a partir de 0,5, mientras que valores de r próximos a 0 pueden ser explicados por azar.

La determinación del intervalo de confianza al 95% para el valor medio de la sensibilidad global a lo largo de 10 años, también nos va a facilitar el análisis de la evolución de la sensibilidad de cada especie bacteriana a cada uno de los ABL. Este parámetro hace posible la detección para cada uno de los años considerados, si el valor medio de la sensibilidad está fuera o dentro del intervalo de confianza y si, en consecuencia, independientemente de la existencia de una evolución mantenida, existen valores que se mantengan dentro de los límites superior e inferior del intervalo de confianza.

7. CARACTERIZACION DE BETALACTAMASAS.

Realizada en cepas de *E. coli* con diferente nivel de resistencia a ampicilina, siguiendo la técnica descrita por Matthew et al. en 1975²⁰⁰. El proceso tiene dos fases bien diferenciadas: en la primera se trata de obtener el extracto crudo enzimático con la máxima concentración de Bla^{236} , mientras que en la segunda se procede a la diferenciación enzimática por medio del isoelectroenfoco (IEE)²⁰⁰.

7.1 OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMATICO.

A partir de cultivos de *E. coli* de 18 horas en agar-sangre se efectúan los siguientes pasos:

- Cultivo de 18 horas en 25 ml de Brain Heart Infusión (BHI) a 35⁰C en baño con agitación.
- Inocular 5 ml del cultivo anterior en 45 ml de BHI. Incubar en baño con agitación 4 horas a 35⁰C.
- Centrifugar el cultivo anterior a 6.000 r.p.m, 30 minutos a 4⁰C, en ultracentrífuga refrigerada Rc-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Dupont Instruments. Sorvall. Descartar el sobrenadante y lavar el depósito con 5 ml de agua destilada y desionizada estéril.
- Centrifugar a 11.000 r.p.m, 10 minutos a 4⁰C, en ultracentrífuga refrigerada Rc-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Dupont Instruments. Sorvall. Descartar el sobrenadante y resuspender el depósito en 7,5 ml de agua destilada y desionizada estéril.
- Sonicar durante 3-4 ciclos de 30 segundos en Sonicator: Branson Sonifier Cell Disruptor 2.000.
- Recoger el sobrenadante y centrifugar a 11.000 r.p.m, 10 minutos a 4⁰C, en ultracentrífuga refrigerada Rc-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Dupont Instruments. Sorvall. Almacenar el sobrenadante-extracto en tubos de poliestireno de 3,5 ml a -20⁰C.

7.2 ISOELECTROENFOQUE (IEE).

Se trata de un método de separación en el que las proteínas se alinean como bandas bien diferenciadas en su punto isoeléctrico en un gradiente de pH producido por electroforesis. Con esta técnica se alcanza un elevado grado de resolución toda vez que el enfoque es causado por fuerzas que actúan contra la difusión y las proteínas-enzimas se concentran durante la separación. Esta se realiza en geles de poliacrilamida y la localización y reconocimiento de las distintas enzimas se efectúa mediante revelado con una solución de nitrocefina que es hidrolizada por las β-las, produciéndose un viraje del color amarillo inicial al rojo. La técnica tiene diferentes fases que incluyen: la preparación del gel de poliacrilamida, la aplicación de los extrac-

tos al gel y la posterior electroforesis, y el revelado, fotografía e interpretación de los resultados mediante el empleo de extractos con β las prototipos bien caracterizadas.

a) Preparación del gel de poliacrilamida. Realizada extemporáneamente para cada ensayo a través de los pasos siguientes:

- Preparación del soporte de vidrio del gel, sobre una lámina de vidrio de 6,5'x8,5' "Glass Prepared for Coating" de Ilford Nuclear Research, colocada entre otras dos láminas de vidrio normal.

- La composición del gel de poliacrilamida incluye: 10 g de acrilamida (Sigma), 290 mg de NN' metilenbisacrilamida (BDH), 100 ml de agua destilada y desionizada estéril, 6,4 ml de ampholine pH 3.5-10.0 (LKB), 0,64 ml de temed al 5% (Eastman Kodak), 15 ml de riboflavina preparada con 5 mg de riboflavina (Sigma) en 250 ml de agua destilada y desionizada estéril. De esta preparación se extraen 50 ml y se llevan al soporte de vidrio aplicando, durante 2 horas, un potente sistema de luz fluorescente que catalizando la reacción entre la riboflavina y el temed favorezca la formación del polímero de poliacrilamida. El gel así formado se mantiene en nevera a 4°C hasta su utilización.

b) Aplicación de los extractos y electroforesis. Incluye los pasos siguientes:

- Determinación semicuantitativa de la actividad β la por medio del "spot test". Para ello, en placa de microdilución, se añaden 50 μ l de cada extracto crudo a 150 μ l de una solución de nitrocefin (50 μ g/ml). El tiempo requerido para virar el color del amarillo al rojo, se emplea como indicador de la cantidad de extracto crudo a disponer en el gel para el IEE. Habitualmente se depositan 3 λ mbdas por cada segundo hasta un máximo de 50 en aquellos extractos de mínima actividad.

- Aplicación en el gel de un máximo de 12 extractos crudos a 2-3 cm del borde, utilizando como testigos 25 μ l de mioglobina y citocromo C.

- La cubeta de electroforesis es de fabricación artesanal, y

requiere como requisito previo la limpieza e impregnación del electrodo positivo con una solución de ácido fosfórico al 5%, y del electrodo negativo con una solución de etanolamina al 5%.

- Colocación del gel en la cubeta de electroforesis, disponiendo los depósitos de extractos crudos sobre el electrodo positivo. Conexión con la fuente de alimentación de corriente LKB 2103 Power Supply, y aplicación de 160 V y 1 W durante 17 horas a 40°C. Una vez transcurrido este periodo de tiempo se modifican las condiciones a 200 V y 1 W durante 1 hora a 40°C.

c) Revelado, fotografía e interpretación. Para el revelado del gel hemos utilizado una lámina de papel Whatman n°54 impregnada con solución de nitrocefín (4,5 mg en 6 ml de fosfato buffer pH 7 0,1 M) aplicada sobre el gel. Transcurridos al menos 10 minutos, y cuando las diferentes bandas de β la se hayan individualizado y visualizado con nitidez, se fotografía con una cámara Polaroid MP-3 y película Polaroid 55 a intervalos de 5 minutos. La interpretación de los resultados y la adscripción del punto isoeléctrico a cada extracto problema se realiza en base a los puntos isoeléctricos de β las prototipos señaladas en el apartado de microorganismos.

8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BETALACTAMASA.

La actividad en unidades de β la de cada extracto crudo se ha determinado por las técnicas espectrofotométricas preconizadas por O'Callaghan et al.²³⁴ y Samuni²¹⁴, en todos los extractos crudos obtenidos de 50 cepas de *E. coli*, diferenciadas por su nivel de resistencia a la ampicilina. Además, para conocer la inactivación microbiológica de cefotaxima y cefpiroma por extractos crudos de *E. coli*, productor de β las TEM-1 y OXA-1, hemos seguido el ensayo microbiológico descrito por Masuda et al.²²⁸.

8.1 DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA.

La concentración en unidades de β la, equivalentes a 1 nmol por segundo por mg de proteína, de cada uno de los extractos crudos se realiza en dos fases. En la primera se determina la actividad β la referida al volumen de cada extracto y posteriormente

se determina el contenido de proteínas de dicho extracto para adscribir el resultado final a mg de proteína del extracto.

a) Concentración de sustrato hidrolizado. Determinada en espectrofotómetro Shimadzu UV-260, Shimadzu Scientific Instruments Inc. Como sustratos betalactámicos hemos empleado soluciones 100 umolar de cefaloridina y nitrocefín en fosfato buffer pH 7 0,1 M, para extractos conteniendo β las TEM-1 y OXA-1 respectivamente. Con un volumen total de 2,5 ml se disponen en la cubeta para cada determinación la cantidad suficiente de solución de sustrato, y 10, 25, 50 y 100 μ l de extracto en función de la actividad β la obtenida cuantitativamente en el "spot test". La longitud de onda utilizada para la lectura de la hidrólisis enzimática varía para ambos sustratos: 260 para la cefaloridina y 495 para el nitrocefín. Se efectúan en cada ensayo 10 lecturas a intervalos de 15 segundos y una temperatura de 37°C, que proporcionan el incremento de absorción correspondiente a la hidrólisis del sustrato, y el valor medio de la pendiente de la gráfica representativa. A partir de estos valores se calcula la concentración de sustrato hidrolizado por segundo y por el volumen añadido, que multiplicado por el coeficiente de extinción molar de cada sustrato nos proporciona la actividad β la en umoles de sustrato hidrolizado por segundo y por el volumen de sustrato añadido en cada caso. En un paso posterior se refiere este valor a mg de proteína en el extracto. Cada una de las determinaciones se ha realizado por triplicado, expresándose al final el valor medio.

b) Determinación del contenido de proteínas. Realizada mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Lowry et al.⁵²⁴. Hemos efectuado las lecturas en un espectrofotómetro Coleman 295 (Perkin Elmer) a 595 nm, utilizando como reactivo una solución diluida al 1/10 de Bio Rad Protein Assay (Bio Rad Laboratories), y soluciones patrón de proteínas a las concentraciones de 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,2 y 0 mg/ml a partir de Albumin Lyophilisat (Boehringer), con las que se elabora la recta patrón. A expensas de ella se calcula el contenido de proteínas de cada uno de los extractos crudos, al que se refiere la actividad β la en nmoles de sustrato hidrolizado por segundo y mg de proteína.

8.2 ENSAYO MICROBIOLOGICO.

La estimación semicuantitativa de la hidrólisis de dos substratos betalactámicos, cefotaxima y cefpiroma, por extractos crudos de Blas TEM-1 y OXA-1, se realiza de acuerdo a la técnica de difusión con disco descrita por Masuda et al²²⁸. Los discos de 30 ug de cefotaxima (BBL) y cefpiroma (BBL) se disponen en el centro de la placa inoculada con *Micrococcus luteus* ATCC 9341 como microorganismo indicador. A su vez, discos en blanco cargados con 15 ul de extracto crudo de *E. coli* productor de Blas TEM-1 y OXA-1 sin diluir y diluidos 1/2, 1/4 y 1/8, se colocan en el borde del halo de inhibición esperado para cefotaxima y cefpiroma. Después de incubar las placas 18 horas a 35⁰-C, se miden los halos de inhibición de cefotaxima y cefpiroma, sin y con la presencia de los discos cargados con los extractos crudos. El crecimiento del microorganismo indicador en el interior de los halos de cefotaxima y cefpiroma, pone de relieve la inactivación de dichos substratos por las Blas contenidas en los extractos crudos.

III.- RESULTADOS

1.- Estructura del apartado

III. RESULTADOS

1. ESTRUCTURA DEL APARTADO.

El análisis de la evolución de la sensibilidad a 9 antibióticos betalactámicos (ABL) de 12 especies bacterianas y la profundización en algunos de los mecanismos de resistencia esenciales de *E. coli*, han generado tan elevado nº de datos que nos ha parecido más conveniente esquematizar este apartado mediante tablas y figuras, recogiendo los comentarios más relevantes de los resultados en la discusión. De esta manera, para cada una de las 12 especies bacterianas se establecen 5 subapartados idénticos, y para *E. coli* se añaden otros que resumen los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos hidrolíticos más frecuentes en esta especie. El esquema, en síntesis es como sigue:

Subapartado 1. Recoge en cuatro tablas el % acumulativo de sensibilidad teniendo en cuenta las concentraciones críticas de cada antimicrobiano utilizadas diariamente durante los 10 años del estudio. En cada columna se expresan el nº de microorganismos inhibidos por cada concentración y el % acumulativo de sensibilidad correspondiente. En la última fila se recogen los valores medios para el total de microorganismos, que posteriormente nos va a permitir calcular, comparativamente para cada año, el coeficiente de correlación de la evolución de la sensibilidad.

Subapartado 2. En dos figuras se condensan las gráficas de la distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano en un amplio rango de CMIs. Para cada antibiótico, el intervalo de concentraciones críticas incluidas en el subapartado anterior se ha ampliado en sus extremos mediante el estudio de la sensibilidad de 20-100 aislamientos, en función de la frecuencia de aislamiento de cada especie, para 4-5 concentraciones inferiores y superiores a las críticas.

Subapartado 3. Resume en una tabla los puntos críticos de sensibilidad (PCSM) y de resistencia (PCRM) para cada antimicrobiano, extraídos del análisis matemático de la distribución ob-

tenida en el subapartado anterior. Asimismo, se recogen en la tabla el tipo de ecuación que se adapta a la distribución, y los valores modales, y de las abscisas máxima, de inflexión y del 95% de inhibición de los aislamientos.

Subapartado 4. En una tabla se esquematizan los fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a ABL. Los primeros se obtienen considerando el % de inhibición para cada ABL en el PCRM, y en ocasiones en el PCSM. Para diferenciar los fenotipos clínicos hemos estimado los valores farmacocinéticos estandar alcanzados en el suero de los pacientes después de la administración terapéutica del antimicrobiano.

Subapartado 5. También mediante una tabla se expresa la evolución de la sensibilidad de cada especie durante los 10 años del estudio, por medio del coeficiente de correlación. Aunque el análisis se ha realizado para cada ABL, en la tabla sólo se muestran los datos referentes a dos concentraciones críticas de 3-4 antibióticos considerados "testigo", en función de los mecanismos de resistencia habituales en cada especie.

2.- *Escherichia coli*

2.1 Escherichia coli: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas. TABLA 1.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤1ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	188	5 2,7	21 11,3	60 32,0	73 38,9	75 39,9	188 100
1978	523	14 2,7	52 10,0	151 29,0	183 35,1	193 37,0	523 100
1979	931	18 1,9	84 9,0	267 28,7	355 38,2	386 41,5	931 100
1980	965	27 2,8	93 9,6	292 30,2	359 37,2	368 38,1	965 100
1981	655	21 3,2	66 10,0	192 29,3	233 35,6	239 36,5	655 100
1982	880	47 5,3	164 18,7	376 42,8	411 46,8	413 47,0	880 100
1983	1058	22 2,1	148 14,0	393 37,1	455 43,0	475 44,9	1058 100
1984	982	22 2,2	133 13,5	355 36,2	416 42,4	419 42,7	982 100
1985	935	12 1,3	60 6,4	242 25,9	330 35,3	343 36,7	935 100
1986	776	8 1,0	60 7,7	22 29,1	294 37,8	299 38,5	776 100
<u>TOTAL</u>	7893	196 2,5	881 11,2	2554 32,4	3109 39,4	3210 40,7	7893 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	188	90 47,9	90 47,9	91 48,4	188 100
1978	523	238 45,5	240 45,9	245 46,8	523 100
1979	931	418 44,9	428 46,0	440 47,3	931 100
1980	965	417 43,2	425 44,0	444 46,0	965 100
1981	655	245 37,4	257 39,2	275 42,0	655 100
1982	880	421 47,8	426 48,4	441 50,1	880 100
1983	1058	493 46,6	509 48,1	524 49,5	1058 100
1984	982	444 45,2	449 45,7	456 46,4	982 100
1985	935	337 36,0	354 37,8	365 49,0	935 100
1986	776	352 45,4	364 46,9	372 47,9	776 100
<u>TOTAL</u>	7893	3455 43,8	3542 44,9	3653 46,3	7893 100

TABLA 2.- E. coli: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	188	55 29,3	110 58,6	149 79,3	163 86,7	174 92,6	180 95,8	188 100
1978	523	165 31,6	331 63,3	436 83,3	468 89,5	491 93,9	505 96,6	523 100
1979	931	247 26,5	546 58,6	702 75,4	781 83,9	847 91,0	883 94,9	931 100
1980	965	320 32,2	561 58,2	741 76,9	830 86,1	899 93,2	931 96,5	965 100
1981	655	245 37,4	392 59,9	530 80,9	573 87,5	615 93,9	633 96,6	635 100
1982	880	283 32,1	552 62,7	730 83,1	802 92,1	838 96,2	856 97,3	880 100
1983	1058	463 43,8	774 73,2	892 84,3	967 91,4	1014 95,8	1034 97,7	1058 100
1984	982	397 40,4	708 72,1	843 85,9	911 92,8	951 96,9	965 98,3	982 100
1985	935	220 23,5	554 59,2	774 82,7	862 92,1	899 95,9	915 97,9	935 100
1986	776	205 26,4	490 63,1	636 81,9	688 88,6	735 94,7	763 98,3	776 100
TOTAL	7893	2600 32,9	5018 63,5	6435 81,5	7045 89,2	7463 94,5	7665 97,1	7893 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	188	98 52,1	128 68,1	146 77,7	160 85,1	171 91,0	179 95,2	188 100
1978	523	230 44,0	314 60,1	381 72,1	426 81,5	456 87,2	488 93,3	523 100
1979	931	492 52,8	650 69,8	716 76,9	781 83,9	832 89,4	885 95,1	931 100
1980	965	456 47,2	628 65,0	749 77,6	835 86,5	890 92,2	929 96,3	965 100
1981	655	319 48,7	421 64,2	506 77,2	566 86,4	596 91,0	629 96,0	655 100
1982	880	488 55,4	624 70,8	717 81,4	785 89,1	828 94,0	854 97,0	880 100
1983	1058	645 61,0	786 74,3	884 83,6	957 90,5	1001 94,6	1027 97,1	1058 100
1984	982	557 56,7	705 71,8	822 83,7	892 90,8	926 94,3	958 97,6	982 100
1985	935	421 45,0	593 63,4	744 79,5	838 89,6	891 95,3	914 97,8	935 100
1986	776	362 46,7	472 60,9	615 79,3	694 89,5	731 94,2	754 97,2	776 100
TOTAL	7893	4068 51,5	5721 67,4	6280 79,6	6934 87,9	7322 92,8	7617 96,5	7893 100

TABLA 3.- E. coli: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.

ANTIBIOTICO: CEFOXITINA.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32ug/ml
1977	188	27 14,4	226 67,1	171 91,0	178 99,7	183 97,4	185 98,5	188 100
1978	523	71 13,6	345 66,0	453 86,6	481 92,0	506 96,8	512 97,9	523 100
1979	931	132 14,2	635 68,2	816 87,7	877 94,3	905 97,3	912 98,0	931 100
1980	965	124 12,8	587 60,8	858 88,9	919 95,2	943 97,7	947 98,1	965 100
1981	655	124 18,9	452 69,0	592 90,4	630 96,2	644 98,3	646 98,6	655 100
1982	880	158 18,0	607 69,0	827 94,0	864 98,3	872 99,2	875 99,5	880 100
1983	1058	270 25,5	752 71,1	1006 95,1	1035 97,8	1051 99,3	1052 99,4	1058 100
1984	982	125 12,8	652 66,5	911 82,9	947 96,5	970 98,8	974 99,2	982 100
1985	935	130 13,9	657 70,3	870 93,1	916 98,0	924 98,9	929 99,4	935 100
1986	776	70 9,0	435 56,1	680 87,7	730 94,1	749 96,5	772 99,5	776 100
TOTAL	7893	1231 15,6	5248 66,5	7184 91,0	7577 96,0	7747 98,2	7804 98,9	7893 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1980	965	858 88,9	951 98,6	958 99,3	963 99,8	964 99,9	964 99,9	965 100
1981	655	590 90,1	634 96,8	643 98,2	650 99,3	653 99,7	655 100	
1982	880	812 92,3	878 99,8	881 99,9	882 100			
1983	1058	959 90,6	1047 98,9	1054 99,6	1058 100			
1984	982	918 93,5	978 99,6	980 99,8	982 100			
1985	935	886 94,8	931 99,6	934 99,9	935 100			
1986	776	664 85,6	748 96,4	769 99,1	773 99,6	775 99,9	775 99,9	776 100
TOTAL	6251	5687 91,0	6167 98,7	6217 99,5	6241 99,9	6247 99,9	6249 99,9	6251 100

TABLA 4.- E. coli: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1981	327	223 68,2	317 96,9	322 98,5	325 99,4	326 99,7	326 99,7	327 100
1982	880	595 67,7	876 99,6	879 99,9	880 100			
1983	1058	821 77,6	1045 98,7	1051 99,3	1056 99,8	1058 100		
1984	982	690 70,3	964 98,2	976 99,4	981 99,9	982 100		
1985	935	643 68,8	925 99,0	928 99,3	934 99,9	935 100		
1986	776	439 56,6	748 96,4	759 97,8	772 99,5	775 99,9	775 99,9	776 100
TOTAL	4958	3411 68,8	4875 98,3	4915 99,1	4948 99,8	4956 99,4	4956 99,4	4958 100

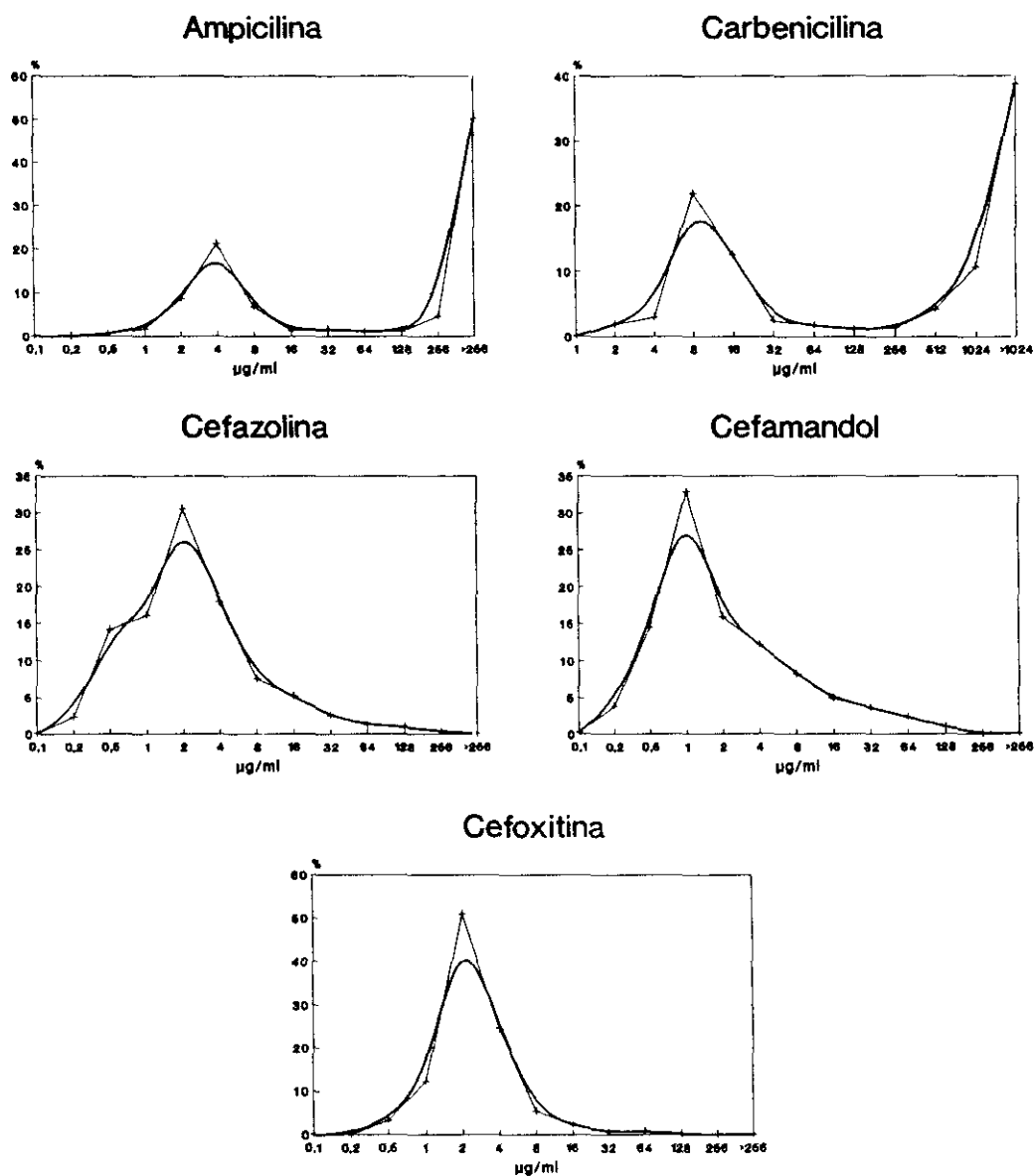
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1983	1058	1007 95,1	1049 99,1	1054 99,6	1057 99,9	1058 100		
1984	982	913 93,0	966 98,4	979 99,7	981 99,9	982 100		
1985	935	879 94,0	927 99,1	934 99,9	934 99,9	935 100		
1986	776	695 89,5	746 96,1	769 99,1	772 99,5	775 99,9	776 100	
TOTAL	3751	3494 93,1	3688 98,3	3756 99,6	3744 99,8	3750 99,9	3751 100	

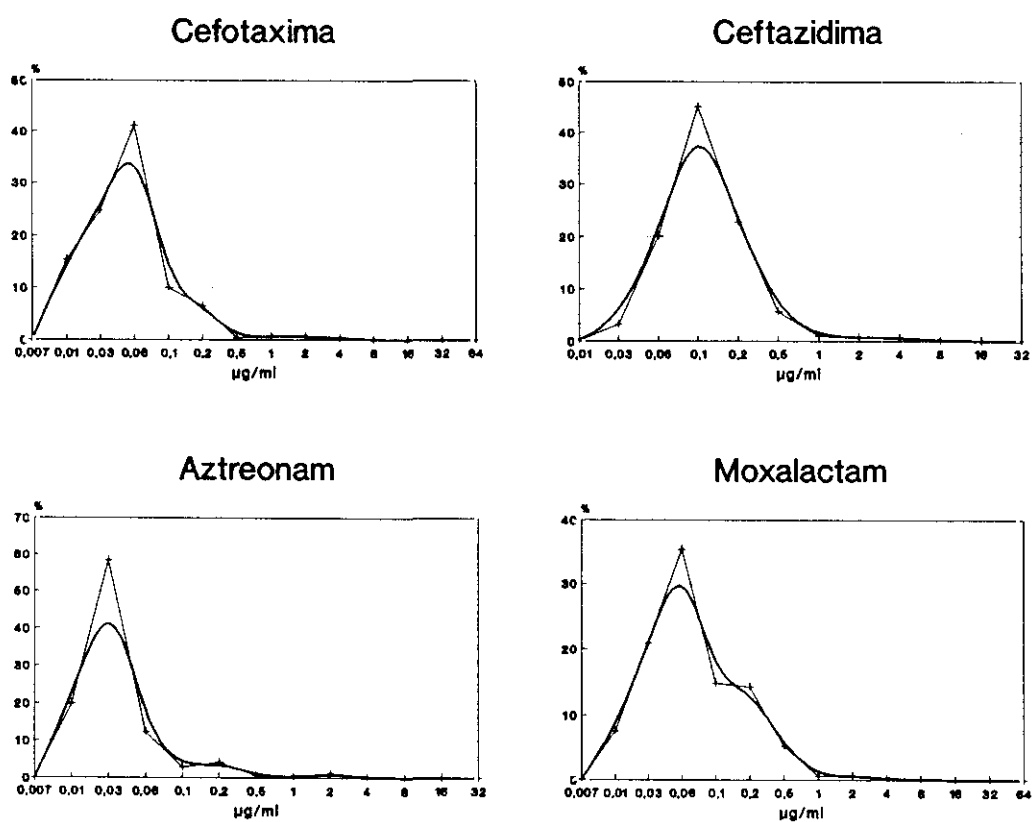
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1980	965	710 73,6	949 98,4	957 99,2	962 99,7	963 99,8	965 100	
1981	655	521 79,6	635 97,0	643 98,2	649 99,1	650 99,3	653 99,7	655 100
1982	880	720 81,8	872 99,8	879 99,9	879 99,9	880 100		
1983	1058	833 78,7	1051 99,3	1054 99,6	1056 99,8	1058 100		
1984	982	859 87,5	980 99,8	981 99,9	982 100			
1985	935	712 76,1	932 99,7	935 100				
1986	776	563 72,6	749 96,6	768 99,0	772 99,5	775 99,9	775 99,9	776 100
TOTAL	6251	4918 78,7	6174 98,8	6217 99,5	6235 99,8	6243 99,9	6248 99,9	6251 100

2.2 *Escherichia coli*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 1.



2.2 *Escherichia coli*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 2.



2.3 Escherichia coli: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 5A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	3Q Grado	4	1,01	2	5,47	6,9	8
Carbenicilina	3Q Grado	8	9,93	8	45,68	46,93	32
Cefazolina	3Q Grado	2	1,46	1	15,66	19,53	16
Cefamandol	3Q Grado	1	1,30	1	14,27	15,95	16
Cefoxitina	3Q Grado	2	1,67	2	10,06	11,14	8
Cefotaxima	3Q Grado	0,06	0,04	0,06	0,19	0,21	0,2
Ceftazidima	3Q Grado	0,1	0,11	0,1	0,77	0,65	0,5
Aztreonam	3Q Grado	0,03	0,03	0,03	0,15	0,12	0,2
Moxalactam	3Q Grado	0,06	0,06	0,06	0,68	0,53	0,5

2.4 Escherichia coli: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 5B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	39,4%	39,4%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	54,2%	52,3%
3	R	R	S	R	S	S	S	S	S	1,4%	1,4%
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	1,3%	1,4%
5	R	R	R	R	R	S	S	S	S	<1%	<1%
6	R	R	R	R	S	R	R	R	S	<1%	<1%
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<1%	--
8	R	S	S	S	S	S	S	S	S	<1%	1,2%
9	R	S	R	S	S	S	S	S	S	<1%	2,8%
10	R	S	R	S	R	S	S	S	S	<1%	<1%
11	R	S	R	R	R	R	R	R	R	1,9%	--

2.5 Escherichia coli: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 5C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Ampicilina	2 ug/ml	- 0,06786
	8 ug/ml	+ 0,19532
Carbenicilina	64 ug/ml	- 0,29963
	>256 ug/ml	+ 0,01756
Cefoxitina	2 ug/ml	+ 0,24202
	8 ug/ml	- 0,01846
Cefotaxima	<0,1 ug/ml	+ 0,52172
	1 ug/ml	- 0,06665

2.6 Escherichia coli: Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa TEM-1. TABLA 6.

ANTIMICROBIANO	CMI (ug/ml)		
	Rango	CMI ₉₀	Moda
Ampicilina	>1024	>1024	>1024
Carbenicilina	>1024	>1024	>1024
Ticarcilina	>1024	>1024	>1024
Azlocilina	1024 - >1024	>1024	>1024
Mezlocilina	64 - >1024	>1024	512
Piperacilina	32 - >1024	>1024	256
Temocilina	2 - 16	8	8
Amoxicilina/A. clavulán.	4/2 - 512/256	32/16	8/4
Ampicilina/Sulbactam	8/4 - >512/256	128/64	64/32
Piperacilina/Tazobactam	2/1 - 256/128	16/8	8/4
Cefalotina	8 - >512	128	64
Cefazolina	2 - >512	64	16
Cefamandol	1 - >512	64	8
Cefuroxima	1 - 8	8	4
Cefoperazona	0,2 - 64	32	4
Cefoxitina	0,5 - 8	4	2
Cefotetan	≤0,1 - 1	0,2	≤0,1
Cefminox	≤0,1 - 2	0,5	0,2
Cefotaxima	≤0,01 - 0,2	0,06	0,03
Ceftizoxima	≤0,01 - 0,1	0,06	0,03
Ceftriaxona	≤0,01 - 0,1	0,06	0,03
Cefpiroma	≤0,01 - 1	0,5	0,06
Ceftazidima	≤0,01 - 0,5	0,2	0,1
Moxalactam	≤0,01 - 0,1	0,1	0,06
Aztreonam	≤0,01 - 0,1	0,06	0,03
Carumonam	≤0,01 - 0,1	0,03	≤0,01
Imipenem	≤0,01 - 0,1	0,1	0,06
Meropenem	≤0,01	≤0,01	≤0,01
Actividad betalactamasa*	7 - 143,7		28,54

* nmoles/sg/mg proteína.

2.7 Escherichia coli: Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa OXA-1. TABLA 7.

ANTIMICROBIANO	CMI (ug/ml)		
	Rango	CMI ₉₀	Moda
Ampicilina	512 - >1024	1024	512
Carbenicilina	1024 - >1024	>1024	1024
Ticarcilina	512 - >1024	1024	1024
Azlocilina	512 - >1024	1024	1024
Mezlocilina	64 - >1024	512	256
Piperacilina	64 - >1024	256	128
Temocilina	2 - 16	8	4
Amoxicilina/A. clavulán.	8/4 - 32/16	32/16	16/8
Ampicilina/Sulbactam	32/16 - 64/32	32/16	32/16
Piperacilina/Tazobactam	16/8 - 64/32	32/16	16/8
Cefalotina	8 - 32	32	16
Cefazolina	2 - 32	16	8
Cefamandol	0,5 - 8	4	1
Cefuroxima	4 - 32	32	8
Cefoperazona	0,06 - 16	8	1
Cefoxitina	1 - 4	2	2
Cefotetan	≤0,1 - 1	0,2	≤0,1
Cefminox	≤0,1 - 2	0,5	0,2
Cefotaxima	≤0,01 - 4	2	0,5
Ceftizoxima	≤0,01 - 4	2	0,5
Ceftriaxona	≤0,01 - 2	1	0,2
Cefpiroma	0,5 - 16	16	4
Ceftazidima	≤0,01 - 0,06	0,06	0,03
Moxalactam	≤0,01 - 1	0,5	0,1
Aztreonam	≤0,01 - 0,03	0,03	0,03
Carumonam	≤0,01 - 0,03	≤0,01	≤0,01
Imipenem	≤0,01 - 0,1	0,1	0,06
Meropenem	≤0,01	≤0,01	≤0,01
Actividad betalactamasa*	0,1 - 10,6		4,78

* nmoles/sg/mg proteína.

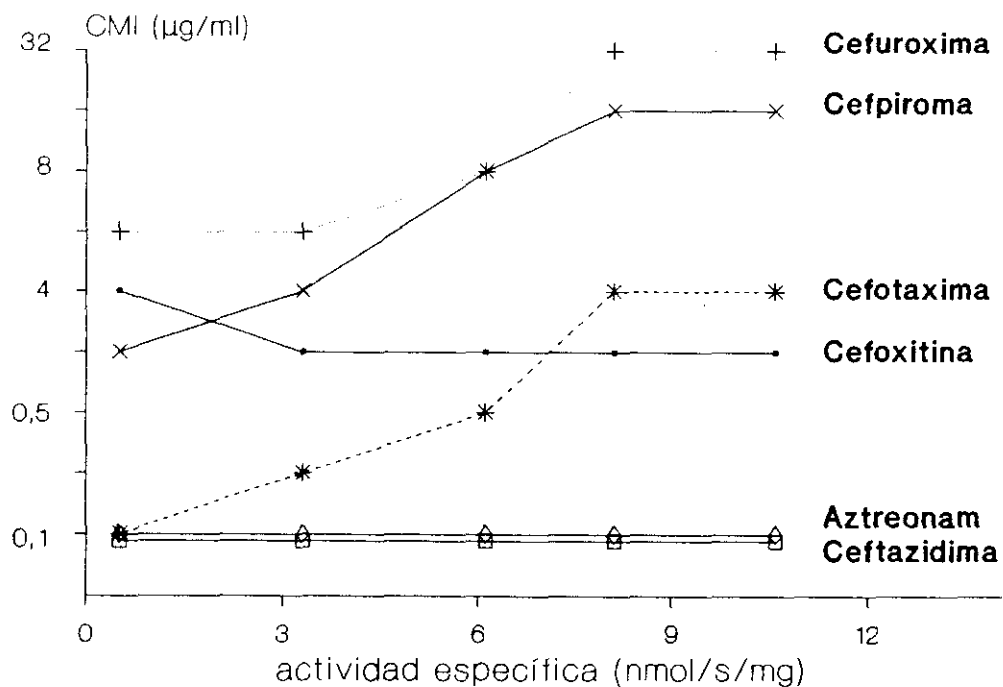
2.8 *Escherichia coli*: Perfil de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasa cromosómica. TABLA 8.

ANTIMICROBIANO	CMI (ug/ml)		
	Rango	CMI ₉₀	Moda
Ampicilina	4 - 512	128	64
Carbenicilina	4 - 32	32	8
Ticarcilina	2 - 32	32	16
Azlocilina	8 - 256	128	32
Mezlocilina	1 - 64	64	16
Piperacilina	1 - 64	64	16
Temocilina	2 - 8	4	2
Amoxicilina/A. clavulán.	2/1 - 64/32	64/32	32/16
Ampicilina/Sulbactam	4/2 - 32/16	32/16	16/8
Piperacilina/Tazobactam	2/1 - 32/16	16/8	16/8
Cefalotina	16 - >512	>512	512
Cefazolina	4 - 512	256	128
Cefamandol	1 - 64	32	8
Cefuroxima	8 - 32	32	16
Cefoperazona	0,06 - 4	2	0,5
Cefoxitina	1 - 32	32	16
Cefotetan	≤0,1 - 4	2	1
Cefminox	0,5 - 16	8	4
Cefotaxima	≤0,01 - 4	4	1
Ceftizoxima	≤0,01 - 2	2	0,5
Ceftriaxona	≤0,01 - 2	4	0,5
Cefpiroma	≤0,01 - 0,03	0,03	≤0,01
Ceftazidima	0,06 - 8	8	2
Moxalactam	≤0,01 - 2	1	0,5
Aztreonam	≤0,01 - 4	4	2
Carumonam	≤0,01 - 2	2	1
Imipenem	≤0,01 - 0,2	0,1	0,06
Meropenem	≤0,01	≤0,01	≤0,01
Actividad betalactamasa*	0 - 7,3		5,15

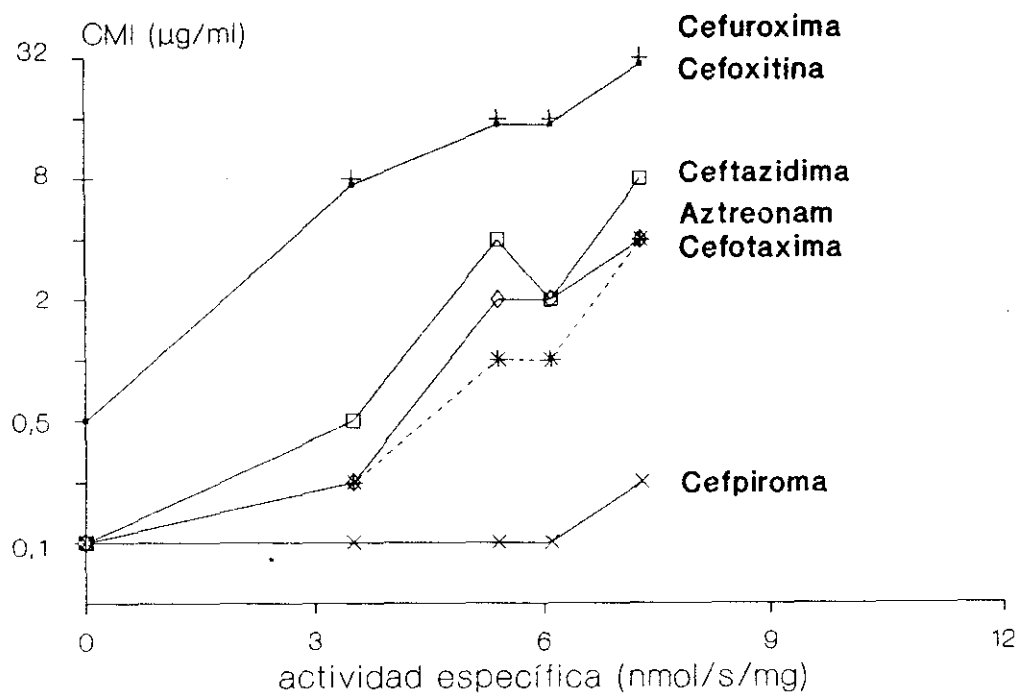
* nmoles/sg/mg proteína.

Figura 3.- *E. coli*: Correlación entre la sensibilidad a antibióticos betalactámicos y la producción de diferentes niveles de betalactamasa OXA-1 y cromosómica.

***E. coli* : β -lactamasa OXA-1**



***E. coli* : β -lactamasa cromosómica**



2.9 Escherichia coli: Patrón diferencial de sensibilidad de los fenotipos productores de betalactamasas cromosómica, OXA-1 y TEM-1. TABLA 9A.

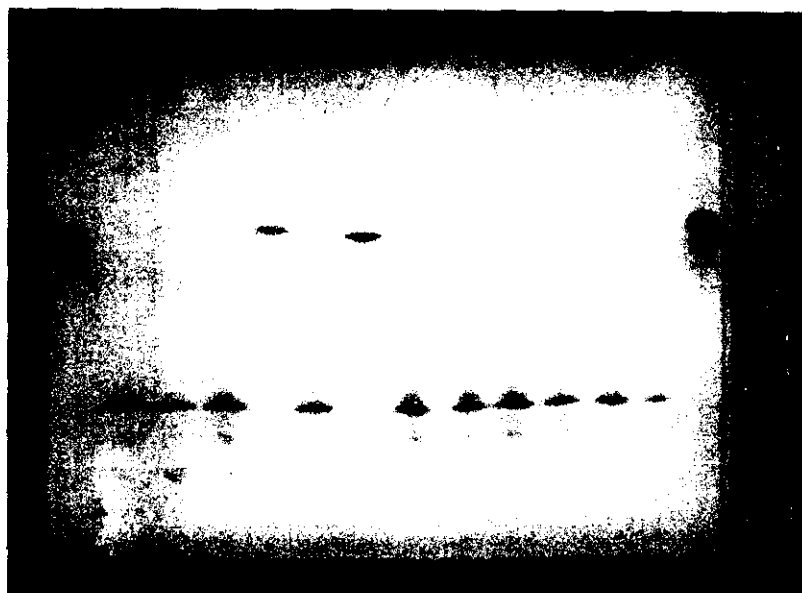
ANTIMICROBIANO	CMI MODA (ug/ml)			
	CROMOSOMICA NIVEL BAJO	CROMOSOMICA HIPERPRODUC.	OXA -1	TEM-1
Ampicilina	2	64	512	>1024
Carbenicilina	4	8	1024	>1024
Piperacilina	2	16	128	256
Temocilina	2	2	4	4
Amx/A. clavul.	2/1	32/16	16/8	8/4
Cefalotina	8	512	16	64
Cefuroxima	4	16	16	4
Cefoperazona	0,1	2	1	4
Cefoxitina	2	16	2	2
Cefotetan	≤0,1	2	≤0,1	≤0,1
Cefotaxima	≤0,01	1	0,5	0,03
Cefpiroma	≤0,01	0,03	4	0,06
Ceftazidima	≤0,01	2	0,03	0,1
Aztreonam	≤0,01	2	0,03	0,03
Imipenem	0,06	0,1	0,06	0,06
Meropenem	≤0,01	≤0,01	≤0,01	≤0,01

2.10 Escherichia coli: Efecto inóculo en cepas con diferente nivel de producción de betalactamasas cromosómica, OXA-1 y TEM-1. TABLA 9B.

Betalactamasa		CMI (ug/ml)							
		Cefotaxima		Cefpiroma		Ceftazidima		Aztreonam	
Tipo	Nivel	10 ³	10 ⁷	10 ³	10 ⁷	10 ³	10 ⁷	10 ³	10 ⁷
Cromos	Bajo	≤0,01	1	≤0,01	0,03	0,06	0,5	0,1	0,5
Cromos	Alto	2	4	0,03	0,06	2	8	2	4
OXA-1	Bajo	≤0,01	1	0,5	8	0,03	0,06	≤0,01	0,03
OXA-1	Alto	0,5	8	1	16	0,06	0,2	0,03	0,1
TEM-1	Bajo	0,03	0,1	0,03	0,06	0,06	0,1	≤0,01	0,03
TEM-1	Alto	0,06	0,5	0,06	0,5	0,1	0,2	0,06	0,06

Figura 4.- IEE de extractos crudos de E. coli con betalactamasas TEM-1, OXA-1 y cromosómicas.

4A.-



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

4B.-

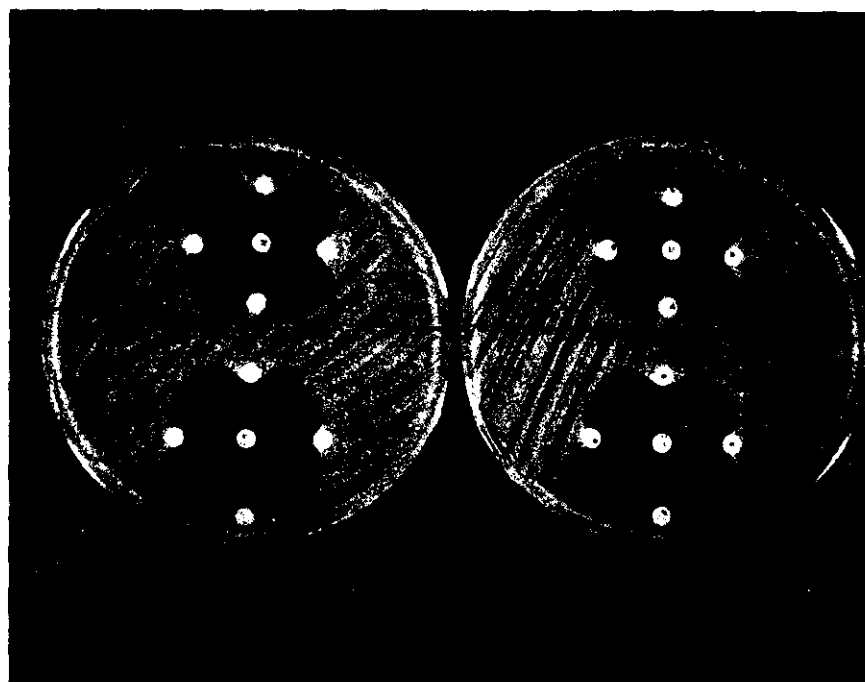


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

4A: Líneas 1 y 14: Mioglobina A/Citocromo C; Línea 2: E. coli J53 (R6K) (TEM-1, pI 5.4); Líneas 3,4,6,8-13: E. coli TEM-1
Línea 5: E. coli 1527E (RGM 238) (OXA-1, pI 7.4); Línea 7: E. coli OXA-1.

4B: Líneas 1 y 15: Mioglobina A/Citocromo C; Línea 2: E. coli J53 (R1010) (SHV-1, pI 7.6); Línea 3: E. coli 1527E (RGM 238) (OXA-1, pI 7.4); Líneas 4,5,12,13: E. coli TEM-1; Líneas 6-9: E. coli *Bla* cromosómica; Línea 10: E. coli TEM-1 + *Bla* cromosómica; Línea 11: E. coli J53 (R6K) (TEM-1, pI 5.4).

Figura 5.- Inactivación de cefpiroma (superior) y cefotaxima (inferior) por extractos crudos de *E. coli* sin diluir y diluidos: 1/2, 1/4 y 1/8, con β la OXA-1. (Test de Masuda).



3.- *Salmonella spp.*

3.1 *Salmonella* spp. % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.

TABLA 10.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	<1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	44	9 20,5	39 88,7	41 93,2	41 93,2	42 95,5	44 100
1978	128	31 24,2	111 86,7	114 89,0	115 89,8	115 89,8	128 100
1979	156	38 24,4	139 89,1	143 91,7	144 92,3	145 92,9	156 100
1980	173	34 19,6	149 86,1	157 90,7	159 91,9	160 92,5	173 100
1981	228	55 24,1	214 93,8	224 98,2	225 98,7	225 98,7	228 100
1982	218	48 22,0	184 84,4	197 90,4	197 90,4	158 90,9	218 100
1983	343	78 22,7	297 86,5	322 93,8	322 93,8	325 94,7	343 100
1984	287	51 17,8	260 90,6	264 92,0	265 92,3	265 92,3	287 100
1985	302	73 24,2	284 94,1	294 97,4	297 98,4	297 98,4	302 100
1986	285	39 13,7	257 90,2	263 92,3	263 92,3	263 92,3	285 100
TOTAL	2164	456 21,1	1934 89,4	2019 93,3	2028 93,7	2035 94,0	2164 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	<64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	44	42 95,5	42 95,5	42 95,5	44 100
1978	128	114 89,1	115 89,9	115 89,9	128 100
1979	156	145 92,9	145 92,9	145 92,9	156 100
1980	173	160 92,5	160 92,5	160 92,5	173 100
1981	228	225 98,7	225 98,7	225 98,7	228 100
1982	218	198 90,8	199 91,3	199 91,3	218 100
1983	343	324 94,5	325 94,8	325 94,8	343 100
1984	287	265 92,3	265 92,3	265 92,3	287 100
1985	302	297 98,3	297 98,3	297 98,3	302 100
1986	285	263 92,3	263 92,3	263 92,3	285 100
TOTAL	2164	2033 93,9	2036 94,0	2036 94,0	2164 100

TABLA 10.- Salmonella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: AMPICILINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	44	9 20,5	39 88,7	41 93,2	41 93,2	42 95,5	44 100
1978	128	31 24,2	111 86,7	114 89,0	115 89,8	115 89,8	128 100
1979	156	38 24,4	139 89,1	143 91,7	144 92,3	145 92,9	156 100
1980	173	34 19,6	149 86,1	157 90,7	159 91,9	160 92,5	173 100
1981	228	55 24,1	214 93,8	224 98,2	225 98,7	225 98,7	228 100
1982	218	48 22,0	184 84,4	197 90,4	197 90,4	158 90,9	218 100
1983	343	78 22,7	297 86,5	322 93,8	322 93,8	325 94,7	343 100
1984	287	51 17,8	260 90,6	264 92,0	265 92,3	265 92,3	287 100
1985	302	73 24,2	284 94,1	294 97,4	297 98,4	297 98,4	302 100
1986	285	39 13,7	257 90,2	263 92,3	263 92,3	263 92,3	285 100
TOTAL	2164	456 21,1	1934 89,4	2019 93,3	2028 93,7	2035 94,0	2164 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	44	42 95,5	42 95,5	42 95,5	44 100
1978	128	114 89,1	115 89,9	115 89,9	128 100
1979	156	145 92,9	145 92,9	145 92,9	156 100
1980	173	160 92,5	160 92,5	160 92,5	173 100
1981	228	225 98,7	225 98,7	225 98,7	228 100
1982	218	198 90,8	199 91,3	199 91,3	218 100
1983	343	324 94,5	325 94,8	325 94,8	343 100
1984	287	265 92,3	265 92,3	265 92,3	287 100
1985	302	297 98,3	297 98,3	297 98,3	302 100
1986	285	263 92,3	263 92,3	263 92,3	285 100
TOTAL	2164	2033 93,9	2036 94,0	2036 94,0	2164 100

TABLA 11.- Salmonella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	32 ug/ml
1977	44	9 20,5	37 84,1	43 97,7	43 97,7	44 100		
1978	128	22 17,2	112 87,5	119 93,0	124 96,9	127 99,2	128 100	
1979	156	24 15,4	132 84,6	147 94,2	150 96,1	154 98,7	156 100	
1980	173	29 16,8	153 88,5	161 93,1	164 94,8	168 97,1	171 98,8	173 100
1981	228	42 18,4	210 92,2	226 99,2	227 99,6	228 100		
1982	218	61 18,1	209 96,0	213 97,8	214 98,2	217 99,6	217 99,6	218 100
1983	343	95 27,7	298 86,9	329 95,9	342 99,7	343 100		
1984	287	70 24,4	272 94,9	278 97,0	279 87,3	286 99,7	286 99,7	287 100
1985	302	40 13,2	289 95,7	301 99,7	302 100			
1986	285	36 12,6	261 91,5	282 98,9	284 99,6	285 100		
TOTAL	2164	428 19,8	1973 91,2	2099 97,0	2129 98,4	2154 99,5	2160 99,8	2164 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	32 ug/ml
1977	44	40 90,9	42 95,4	43 97,7	44 100			
1978	128	113 88,3	117 91,4	120 93,7	123 96,0	125 97,6	127 99,2	128 100
1979	156	132 84,6	142 91,1	148 94,9	153 98,2	154 98,8	155 99,4	156 100
1980	173	151 87,3	155 89,6	161 93,1	164 94,8	165 95,4	169 97,7	173 100
1981	228	205 89,9	218 95,6	225 98,7	228 100			
1982	218	94 89,0	204 93,5	212 97,2	214 98,1	216 99,0	217 99,5	218 100
1983	343	313 91,2	329 95,9	342 99,7	343 100			
1984	287	266 92,8	274 95,6	277 96,6	279 97,3	280 97,6	236 99,7	287 100
1985	302	291 96,3	299 98,9	301 99,6	302 100			
1986	285	261 91,6	271 95,2	283 99,4	284 99,7	285 100		
TOTAL	2164	1966 90,8	2051 94,7	2112 97,6	2134 98,6	2142 99,0	2156 99,6	2164 100

TABLA 12.- Salmonella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTITINA.**

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1977	44	7 15,9	34 77,3	42 95,5	44 100	
1978	128	25 19,5	107 83,6	123 96,1	128 100	
1979	156	31 19,9	141 90,4	153 98,1	155 99,4	156 100
1980	173	33 19,1	141 81,5	169 97,7	172 99,4	173 100
1981	228	49 21,5	193 84,6	224 98,2	227 99,5	228 100
1982	218	44 20,2	191 87,6	218 100		
1983	343	62 18,1	307 89,5	342 99,7	343 100	
1984	287	39 13,6	257 89,5	283 98,6	287 100	
1985	302	45 14,9	246 81,5	296 98,1	302 100	
1986	285	35 12,3	235 82,5	281 98,6	284 99,7	285 100
TOTAL	2164	370 17,1	1852 85,6	2131 98,5	2160 99,8	2164 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤0,1 ug/ml	≤1 ug/ml
1980	173	160 92,5	173 100
1981	228	206 90,3	228 100
1982	218	209 95,9	218 100
1983	343	297 86,6	343 100
1984	287	268 93,4	287 100
1985	302	287 95,0	302 100
1986	285	258 90,5	285 100
TOTAL	1836	1685 91,8	1836 100

TABLA 13.- Salmonella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1981	146	33	22,6	146	100
1982	218	64	29,3	218	100
1983	343	82	23,9	343	100
1984	287	56	19,5	287	100
1985	302	61	20,2	302	100
1986	285	63	22,1	285	100
TOTAL	1581	359	22,7	1581	100

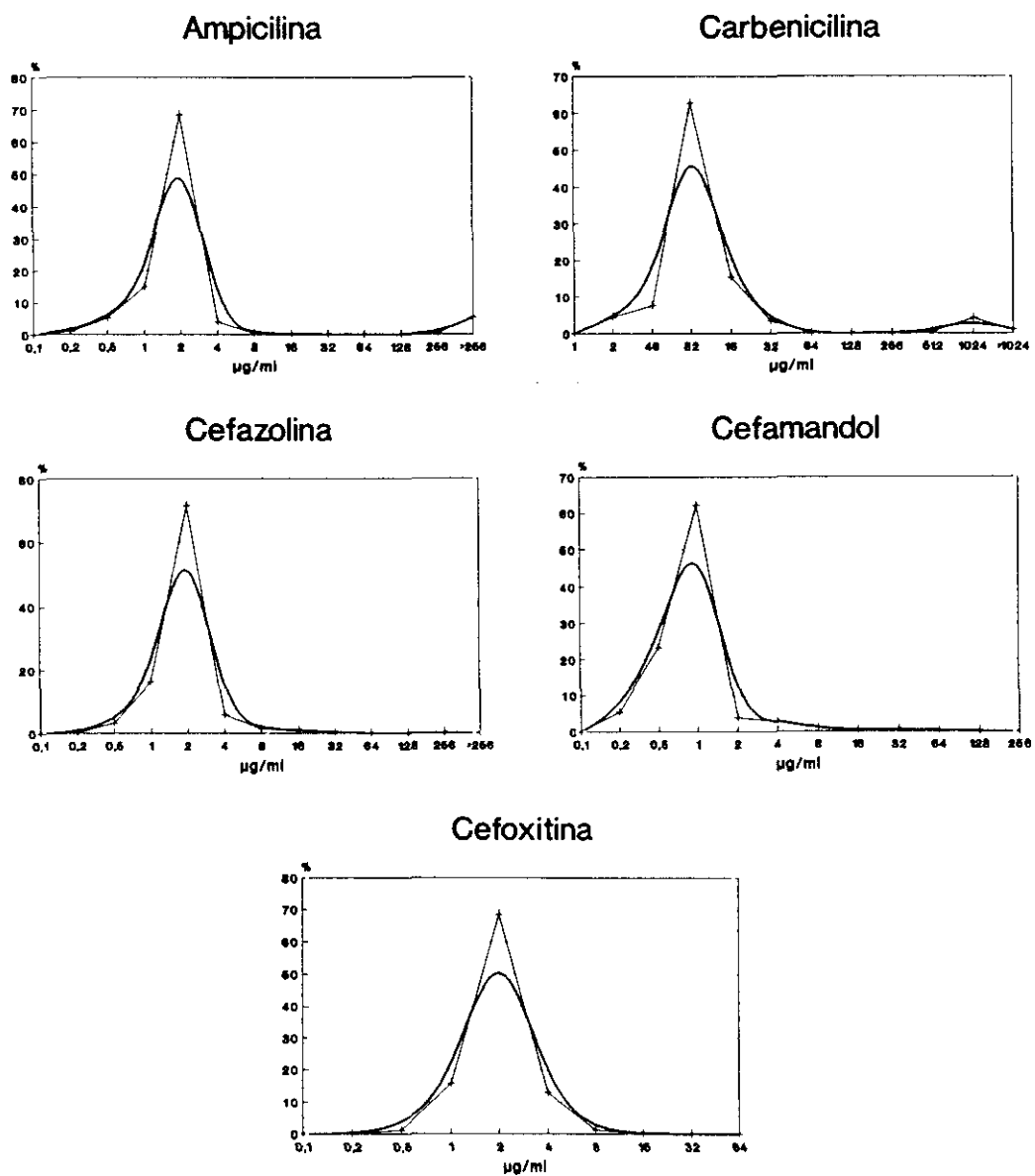
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1983	343	202	88,0	343	100
1984	287	259	90,2	287	100
1985	302	269	89,1	302	100
1986	285	251	88,1	285	100
TOTAL	1217	1081	88,7	1217	100

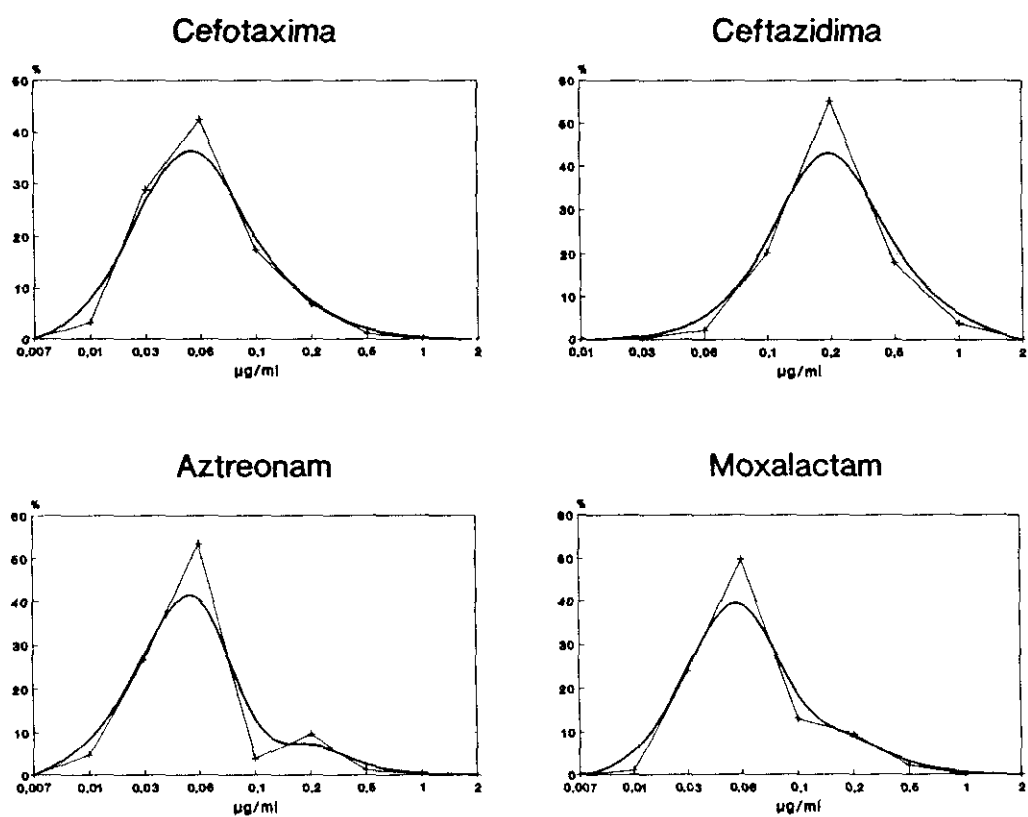
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1980	173	155	89,6	173	100
1981	228	205	89,9	228	100
1982	218	185	84,9	218	100
1983	343	301	87,7	343	100
1984	287	265	92,3	287	100
1985	302	256	84,8	302	100
1986	285	250	87,7	285	100
TOTAL	1836	1617	88,1	1836	100

3.2 *Salmonella* spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 6.



3.2 *Salmonella* spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 7.



3.3 Salmonella spp: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 14A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	30 Grado	2	1,28	1	11,79	9,44	8
Carbenicilina	30 Grado	8	3,13	4	64,70	35,27	32
Cefazolina	30 Grado	2	1,26	1	10,68	9,99	8
Cefamandol	30 Grado	1	0,78	1	5,42	3,86	4
Cefoxitina	20 Grado	2	1,98	2	-	10,93	8
Cefotaxima	20 Grado	0,06	0,07	0,06	-	0,24	0,5
Ceftazidima	20 Grado	0,20	0,19	0,2	-	0,62	1
Aztreonam	20 Grado	0,06	0,08	0,06	-	0,34	0,5
Moxalactam	20 Grado	0,06	0,08	0,06	-	0,34	0,5

3.4 Salmonella spp: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 14B.

Antibióticos betalactámicos									Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol. Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	93,7%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	3,9%
3	R	R	S	R	S	S	S	S	S	<1%
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	1,4%
5	R	S	R	R	R	R	R	R	R	0,2%

3.5 Salmonella spp: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 14C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)	
Ampicilina	<1 ug/ml	-	0,45613
	8 ug/ml	+	0,33187
Carbenicilina	<64 ug/ml	+	0,18265
	>256 ug/ml	+	0,18265
Cefoxitina	2 ug/ml	+	0,23177
	8 ug/ml	-	0,64253
Cefotaxima	<0,1 ug/ml	+	0,02182
	<1 ug/ml	+	0,02182

4.- *Shigella spp.*

4.1 *Shigella* spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.

TABLA 15.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤ 1ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	12	1 8,3	6 50,0	9 75,0	9 75,0	9 75,0	12 100
1978	48	3 6,2	21 43,8	31 64,6	32 66,7	32 66,7	48 100
1979	64	2 3,1	27 42,2	41 64,1	41 64,1	41 64,1	64 100
1980	76	2 2,6	13 17,1	19 25,0	19 25,0	19 25,0	76 100
1981	38	2 5,3	9 23,7	13 34,2	13 34,2	13 34,2	38 100
1982	91	1 1,1	3 3,3	5 5,5	6 6,6	7 7,7	91 100
1983	36	1 2,8	8 22,2	12 33,3	12 33,3	12 33,3	36 100
1984	17	0 0	7 41,2	9 53,0	9 53,0	9 53,0	17 100
1985	9	0	2	3	3	3	9
1986	10	1 10,0	2 20,0	2 20,0	2 20,0	2 20,0	10 100
TOTAL	401	13 3,2	98 24,4	144 35,9	146 36,4	147 36,7	401 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	12	9 75,0	9 75,0	9 75,0	12 100
1978	48	32 66,7	32 66,7	32 66,7	48 100
1979	64	41 64,1	41 64,1	41 64,1	64 100
1980	76	19 25,0	19 25,0	19 25,0	76 100
1981	38	13 34,2	13 34,2	13 34,2	38 100
1982	91	8 8,8	8 8,8	8 8,8	91 100
1983	36	12 33,3	12 33,3	12 33,3	36 100
1984	17	9 52,9	9 52,9	9 52,9	17 100
1985	9	3	3	3	9
1986	10	2 20,0	2 20,0	2 20,0	10 100
TOTAL	401	148 36,9	148 36,9	148 36,9	401 100

TABLA 16.- Shigella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1977	12	3 25,0	10 83,3	12 100		
1978	48	13 27,1	36 75,0	47 97,9	48 100	
1979	64	18 28,1	46 71,8	61 95,2	62 96,8	64 100
1980	76	20 26,3	53 69,8	73 96,1	75 98,7	76 100
1981	38	9 23,7	26 68,4	36 94,7	38 100	
1982	91	15 16,5	63 69,2	89 97,8	90 98,9	91 100
1983	36	15 41,7	25 69,5	31 86,2	36 100	
1984	17	8 47,1	14 82,4	16 94,2	17 100	
1985	9	1	5	8	9	
1986	10	0 0	5 50,0	9 90,0	10 100	
<u>TOTAL</u>	401	102 25,4	283 70,6	382 95,3	397 99,0	401 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1977	12	6 50,0	10 83,3	12 100		
1978	48	31 64,4	41 85,4	47 97,9	47 97,9	48 100
1979	64	38 59,3	54 84,2	62 96,8	63 98,4	64 100
1980	76	43 56,6	61 80,3	74 97,4	75 98,7	76 100
1981	38	24 63,1	30 78,9	36 94,7	38 100	
1982	91	30 33,0	66 72,6	84 92,4	90 98,9	91 100
1983	36	22 61,1	28 77,8	33 91,7	35 97,2	36 100
1984	17	10 58,8	13 76,4	15 88,2	17 100	
1985	9	5	7	8	9	
1986	10	5 50,0	8 80,0	9 90,0	10 100	
<u>TOTAL</u>	401	214 53,4	318 79,3	380 94,8	396 98,8	401 100

TABLA 17.- Shigella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTIXIMA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1977	12	4 33,3	11 91,6	12 100			
1978	48	19 39,6	44 91,7	47 97,9	48 100		
1979	64	25 39,1	61 95,2	63 98,4	64 100		
1980	76	25 32,9	66 86,8	74 97,4	75 98,7	76 100	
1981	38	13 34,2	35 92,1	37 97,4	38 100		
1982	91	35 38,5	84 92,3	89 97,8	90 98,9	90 88,9	91 100
1983	36	15 41,6	34 94,4	36 100			
1984	17	7 41,2	16 94,1	17 100			
1985	9	3	8	9			
1986	10	3 30,0	9 90,0	10 100			
TOTAL	401	149 37,2	368 91,8	394 98,4	399 99,6	400 99,8	401 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1980	76	72 94,7	76 100
1981	38	37 97,4	38 100
1982	91	89 97,8	91 100
1983	36	35 97,2	36 100
1984	17	17 100	
1985	9	8	9
1986	10	9 90,0	10 100
TOTAL	277	267 96,4	277 100

TABLA 18.- Shigella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1981	23	21	91,3	23	100
1982	91	89	97,8	91	100
1983	36	34	94,4	36	100
1984	17	15	88,2	17	100
1985	9	8		9	
1986	10	9	90,0	10	100
TOTAL	186	175	94,1	186	100

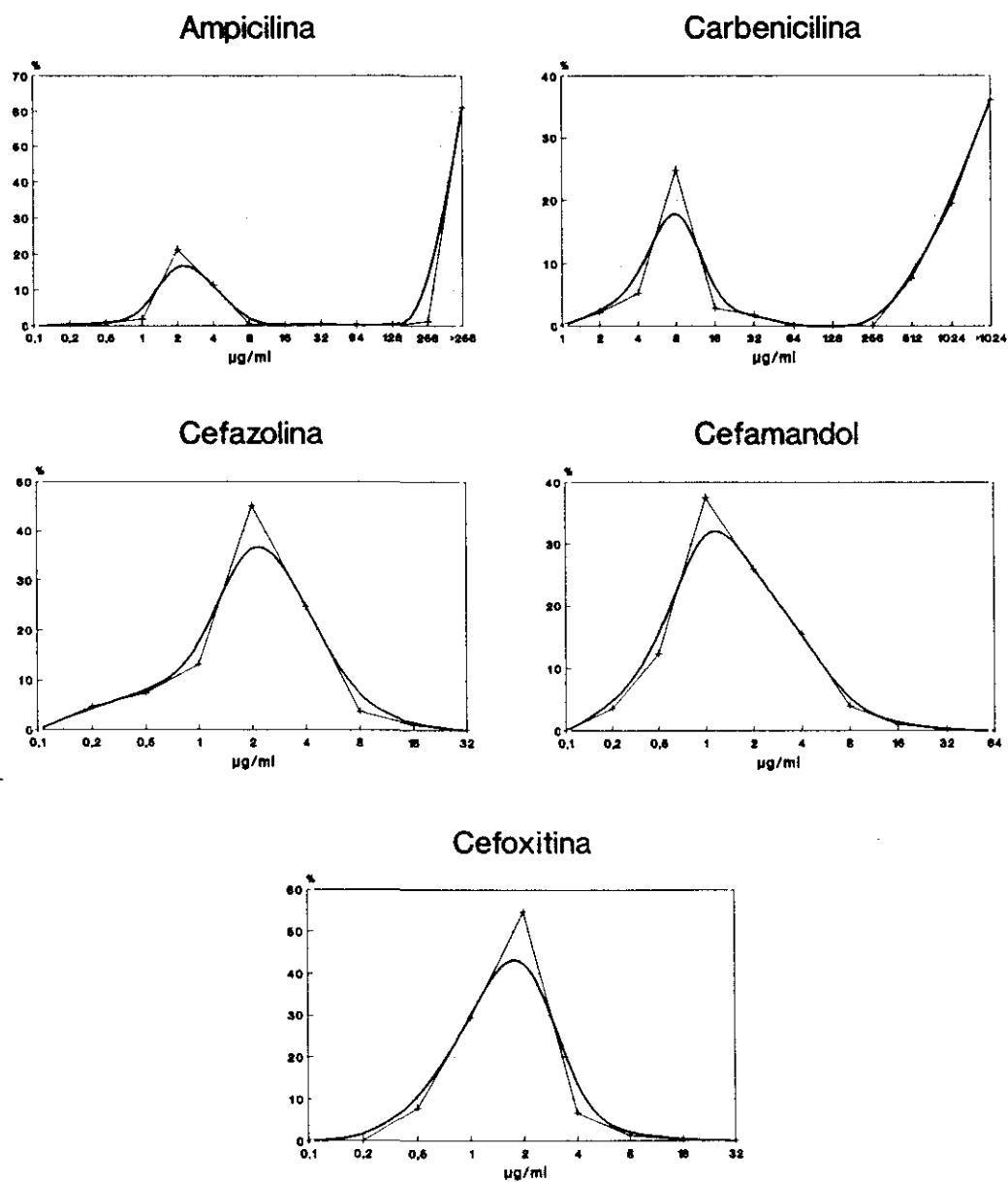
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1983	36	36	100		
1984	17	17	100		
1985	9	9		302	100
1986	10	9	90,0	10	100
TOTAL	72	71	98,6	72	100

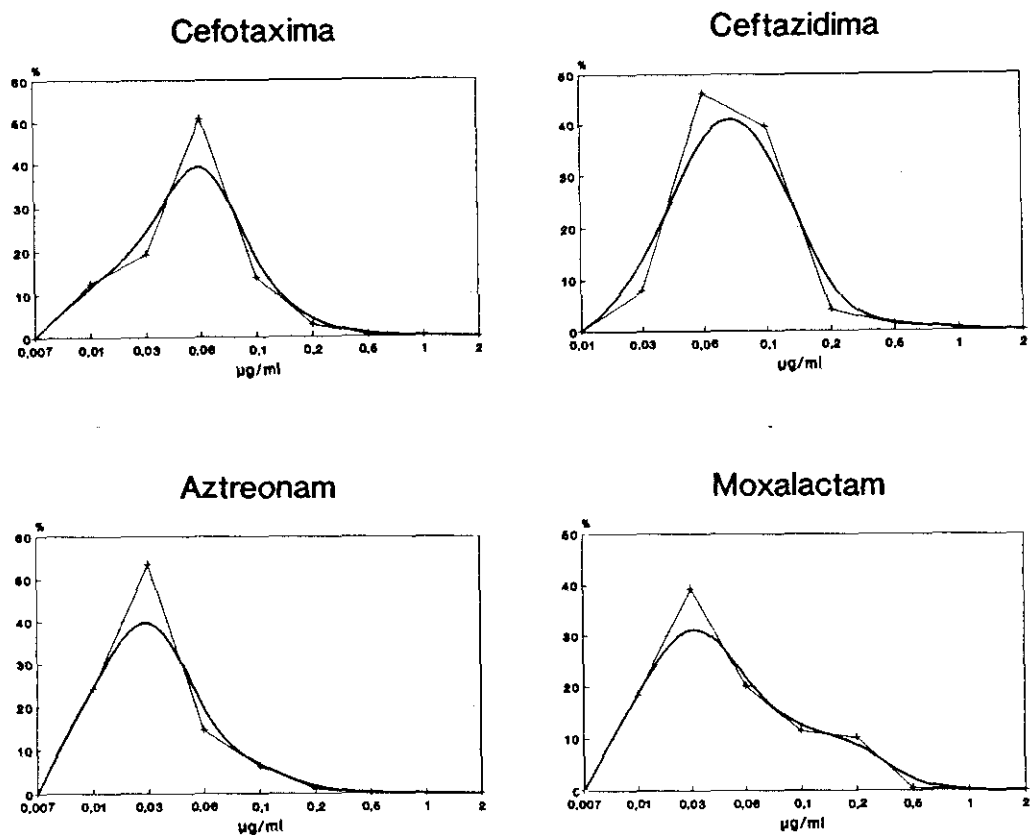
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml		≤ 1 ug/ml	
1980	76	68	89,5	76	100
1981	38	33	86,8	38	100
1982	91	82	90,1	91	100
1983	36	32	88,9	36	100
1984	17	15	88,2	17	100
1985	9	8		9	
1986	10	9	90,0	10	100
TOTAL	277	247	89,2	277	100

4.2 *Shigella* spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 8.



4.2 *Shigella* spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 9.



4.3 *Shigella* spp: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 19A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	3Q Grado	2	0,88	1	5,14	3,83	4
Carbenicilina	3Q Grado	8	4,41	4	25,53	30,05	32
Cefazolina	2Q Grado	2	2,11	2	-	11,74	8
Cefamandol	2Q Grado	1	1,79	2	-	6,96	8
Cefoxitina	2Q Grado	2	2,08	2	-	10,92	8
Cefotaxima	2Q Grado	0,06	0,06	0,06	-	0,23	0,2
Ceftazidima	2Q Grado	0,06	0,10	0,1	-	0,30	0,5
Aztreonam	2Q Grado	0,03	0,04	0,03	-	0,17	0,2
Moxalactam	2Q Grado	0,03	0,06	0,06	-	0,23	0,2

4.4 *Shigella* spp: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 19B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	35,9%	36,4%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	62,2%	63,1%
3	R	R	S	R	S	S	S	S	S	<1%	--
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	<1%	--
5	R	S	R	S	S	S	S	S	S	<1%	<1%
6	R	S	R	R	R	R	R	R	R	<1%	--

4.5 *Shigella* spp: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 19C.

Antimicrobiano	Concentración	Coefficiente de correlación (r)
Ampicilina	≤1 ug/ml	+ 0,08518
	4 ug/ml	- 0,64577
Carbenicilina	≤64 ug/ml	+ 0,66273
	>256 ug/ml	+ 0,66273
Cefoxitina	2 ug/ml	+ 0,04104
	8 ug/ml	----
Cefotaxima	≤0,1 ug/ml	- 0,38267
	≤1 ug/ml	- 0,38267

5.- *Proteus mirabilis*

5.1 *Proteus mirabilis*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.
TABLA 20.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	63	28 44,4	36 57,1	39 61,9	40 63,5	41 65,1	63 100
1978	148	60 40,6	75 50,7	85 57,4	92 62,1	95 64,2	148 100
1979	213	88 41,3	120 56,3	129 60,5	131 62,4	138 64,8	213 100
1980	195	80 41,0	102 52,3	111 56,9	118 60,5	120 61,5	195 100
1981	250	83 37,2	117 46,8	127 50,8	134 53,6	138 55,2	250 100
1982	297	118 39,7	143 48,2	157 52,9	163 54,9	166 55,9	297 100
1983	347	134 38,6	176 50,7	200 57,6	207 59,6	215 61,9	247 100
1984	345	133 38,6	184 53,4	198 57,5	205 59,5	213 61,8	345 100
1985	340	161 47,3	191 56,1	204 59,9	208 61,1	213 62,6	340 100
1986	225	101 44,9	145 64,5	153 68,1	154 68,5	157 69,8	225 100
<u>TOTAL</u>	2423	986 40,7	1289 53,2	1403 57,9	1454 60,0	1496 61,7	2423 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	63	47 74,6	50 79,4	52 82,5	63 100
1978	148	108 73,0	115 77,7	122 82,4	148 100
1979	213	155 72,8	167 78,4	177 83,1	213 100
1980	195	140 71,8	146 74,9	155 79,5	195 100
1981	250	186 74,4	191 76,4	153 77,2	250 100
1982	297	214 72,0	219 73,7	226 76,1	297 100
1983	347	251 72,3	257 74,0	268 77,2	347 100
1984	345	250 72,5	256 74,3	268 77,7	345 100
1985	340	260 76,5	270 79,4	275 80,9	340 100
1986	225	196 87,1	200 88,9	201 89,3	225 100
<u>TOTAL</u>	2423	1807 74,6	1871 77,2	1937 79,9	2423 100

TABLA 21.- P. mirabilis: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	32 ug/ml
1977	63	2 3,2	12 19,1	40 63,6	50 79,5	55 87,4	57 90,5	63 100
1978	148	4 2,7	28 18,9	93 62,8	115 77,7	122 82,4	130 87,8	148 100
1979	213	4 1,9	27 12,7	123 57,8	160 75,2	172 80,8	184 86,4	213 100
1980	195	9 4,6	25 12,8	113 57,9	146 74,8	160 82,1	170 87,2	195 100
1981	250	8 3,2	38 15,2	143 57,2	181 72,4	197 78,8	207 82,8	250 100
1982	297	11 3,7	39 13,1	154 51,8	196 65,9	225 75,3	246 82,8	297 100
1983	347	11 3,1	50 14,2	194 54,7	232 65,6	262 74,2	279 79,1	347 100
1984	345	11 3,2	31 9,0	204 59,1	249 72,1	272 78,8	291 84,3	345 100
1985	340	3 0,9	14 4,1	196 57,6	261 76,7	293 86,1	308 90,6	340 100
1986	225	5 2,2	24 10,6	159 70,6	193 85,7	201 89,3	208 92,4	225 100
TOTAL	2423	68 2,8	288 10,9	1419 58,6	1783 73,6	1959 80,9	2079 85,9	2423 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	32 ug/ml
1977	63	35 55,6	44 69,9	49 77,8	51 81,0	55 87,3	57 90,5	63 100
1978	148	87 58,8	110 74,3	122 82,4	125 84,4	130 87,8	134 90,5	148 100
1979	213	123 57,7	152 71,3	173 81,2	178 83,5	186 87,2	190 89,1	213 100
1980	195	113 57,9	141 72,2	155 79,4	161 82,5	168 86,1	154 89,2	195 100
1981	250	122 48,8	161 64,4	193 77,2	199 79,6	205 82,0	213 85,2	250 100
1982	297	167 56,2	205 69,0	226 76,1	238 80,1	243 81,8	250 84,2	297 100
1983	347	166 47,8	222 63,9	257 74,0	267 76,8	276 79,4	285 82,0	347 100
1984	345	182 52,7	239 69,2	265 76,7	278 80,6	285 82,6	294 85,2	345 100
1985	340	229 65,3	281 82,6	296 87,0	300 88,2	303 89,1	307 90,3	340 100
1986	225	144 64,0	181 80,4	196 87,1	203 90,2	207 92,0	210 93,3	225 100
TOTAL	2423	1368 56,4	1736 71,6	1932 79,7	2000 82,5	2058 84,9	2114 87,3	2423 100

TABLA 22.- P. mirabilis: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOXITINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	63	4 6,3	21 33,3	59 93,6	62 98,4	63 100		
1978	148	13 8,8	50 33,8	133 90,0	143 96,7	145 98,0	148 100	
1979	213	8 3,8	69 32,4	194 91,1	207 97,2	211 99,1	213 100	
1980	195	19 9,7	63 32,3	175 89,7	187 95,9	191 98,0	192 98,5	195 100
1981	250	22 8,8	78 31,2	220 88,0	236 94,4	243 97,2	244 97,6	250 100
1982	297	10 3,4	89 30,0	262 88,2	289 97,3	297 100		
1983	347	24 6,9	126 36,4	317 91,4	336 96,9	341 98,3	344 99,2	347 100
1984	345	16 4,6	106 30,7	299 86,6	339 98,2	343 99,4	343 99,4	345 100
1985	340	12 3,5	112 32,9	318 93,5	338 99,4	339 99,7	340 100	
1986	225	7 3,2	55 24,5	200 89,0	220 97,9	223 99,2	224 99,6	225 100
TOTAL	2423	135 5,6	769 31,8	2177 89,9	2357 97,3	2396 98,9	2408 99,4	2423 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	0,1 ug/ml	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml
1980	195	191 97,9	195 100			
1981	250	244 97,6	249 99,6	249 99,6	249 99,6	250 100
1982	297	296 99,7	297 100			
1983	347	335 96,5	344 99,1	345 99,4	345 99,4	347 100
1984	345	333 96,5	344 99,7	344 99,7	344 99,7	345 100
1985	340	335 98,5	339 98,7	339 98,7	339 98,7	340 100
1986	225	220 97,8	225 100			
TOTAL	1999	1954 97,7	1993 99,6	1994 99,7	1994 99,7	1999 100

TABLA 23.- P. mirabilis: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1981	99	91 91,9	99 100				
1982	297	262 88,2	297 100				
1983	347	320 92,2	346 99,7	346 99,7	346 99,7	346 99,7	347 100
1984	345	335 97,1	344 99,7	344 99,7	345 100		
1985	340	335 98,5	339 99,7	339 99,7	339 99,7	339 99,7	340 100
1986	225	219 97,3	225 100				
TOTAL	1653	1564 94,5	1650 99,8	1650 99,8	1651 99,9	1651 99,9	1653 100

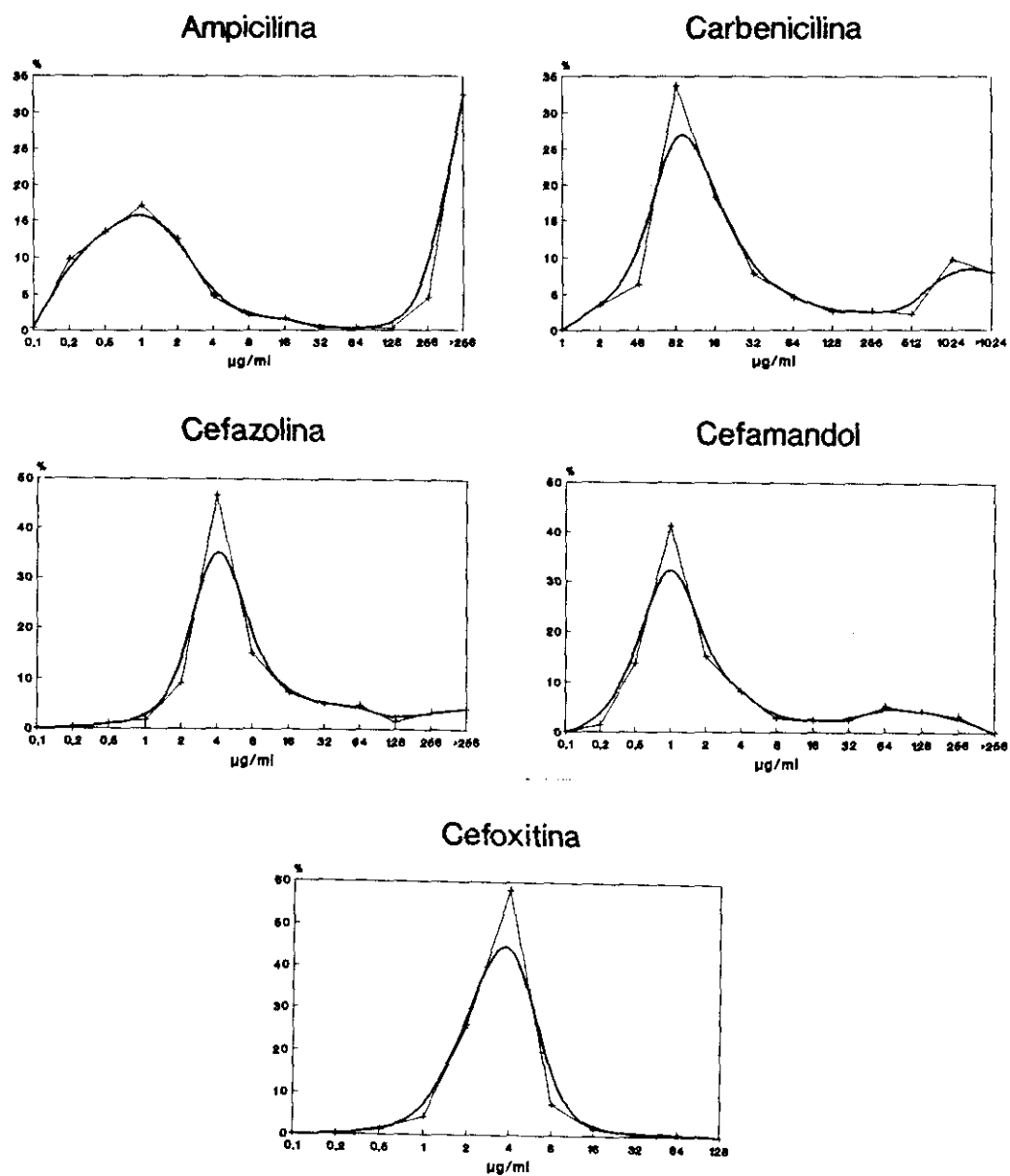
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1983	347	339 97,7	346 99,7	346 99,7	346 99,7	346 99,7	347 100
1984	345	341 98,8	344 99,7	344 99,7	344 99,7	344 99,7	345 100
1985	340	335 98,5	339 99,7	339 99,7	339 99,7	340 100	
1986	225	221 98,2	225 100				
TOTAL	1257	1236 98,3	1254 99,7	1254 99,7	1254 99,7	1256 99,9	1257 100

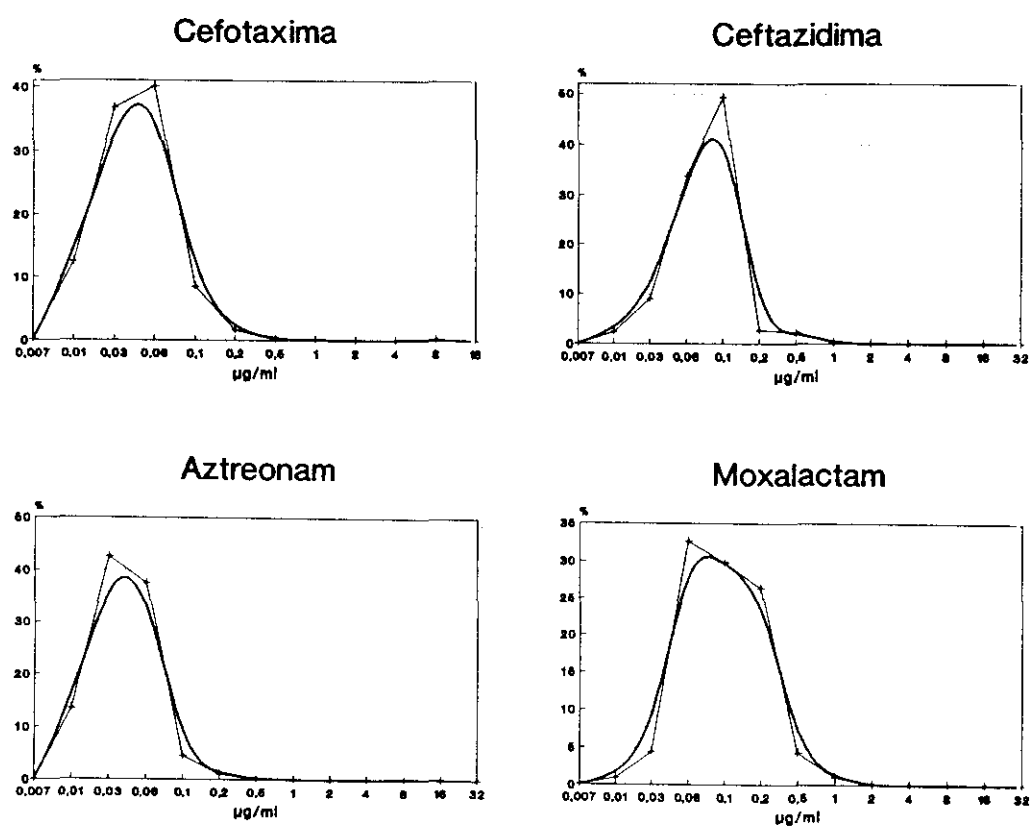
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1980	195	139 71,3	195 100					
1981	250	179 71,6	249 99,6	249 99,6	249 99,6	250 100		
1982	297	193 65,0	297 100					
1983	347	217 62,5	347 100					
1984	345	250 72,5	344 99,7	344 99,7	344 99,7	344 99,7	345 100	
1985	340	225 66,2	339 99,7	339 99,7	339 99,7	339 99,7	339 99,7	340 100
1986	225	157 69,8	225 100					
TOTAL	1999	1360 68,0	1996 99,8	1996 99,8	1996 99,8	1997 99,9	1998 99,9	1999 100

5.2 *Proteus mirabilis*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 10.



5.2 *Proteus mirabilis*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 11.



5.3 Proteus mirabilis: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 24A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	30 Grado	1	0,77	1	5,68	4,43	4
Carbenicilina	30 Grado	8	7,21	8	53,42	121,35	128
Cefazolina	30 Grado	4	3,42	4	18,87	34,42	32
Cefamandol	30 Grado	1	1,19	1	11,77	15,27	16
Cefoxitina	20 Grado	4	3,73	4	-	14,22	16
Cefotaxima	30 Grado	0,06	0,05	0,06	0,18	0,20	0,2
Ceftazidima	30 Grado	0,1	0,09	0,1	0,62	0,41	0,5
Aztreonam	30 Grado	0,03	0,04	0,06	0,26	0,23	0,2
Moxalactam	30 Grado	0,06	0,18	0,2	0,94	0,65	0,5

5.4 Proteus mirabilis: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 24B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	57,9%	60,0%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	9,1%	10,3%
3	R	R	S	R	S	S	S	S	S	<1%	<1%
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	12,4%	14,2%
5	R	R	R	R	R	S	S	S	S	<1%	<1%
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<1%	--
7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	17,5%	9,6%
8	R	S	R	S	S	S	S	S	S	<1%	4,2%
9	R	S	R	S	R	S	S	S	S	<1%	<1%
10	R	S	R	R	R	S	S	S	R	<1%	--
11	R	S	R	R	R	R	R	R	R	<1%	--

5.5 Proteus mirabilis: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 24C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Ampicilina	<1 ug/ml	+ 0,17261
	4 ug/ml	+ 0,23992
Carbenicilina	<64 ug/ml	+ 0,53768
	>256 ug/ml	+ 0,18906
Cefoxitina	4 ug/ml	- 0,27052
	16 ug/ml	- 0,07256
Cefotaxima	<0,1 ug/ml	- 0,31891
	<1 ug/ml	- 0,31891

6.- *Klebsiella spp.*

6.1 *Klebsiella* spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.
TABLA 25.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	58		1 1,7	2 3,4	3 5,1	5 8,6	58 100
1978	218	1 0,5	3 1,4	7 3,2	11 5,0	22 10,1	218 100
1979	342	2 0,6	5 1,5	8 2,4	13 3,9	25 7,4	342 100
1980	312	1 0,3	2 0,6	6 1,9	14 4,5	37 11,9	312 100
1981	303		1 0,3	6 2,0	11 3,7	42 13,9	303 100
1982	296	1 0,3	3 1,0	6 2,0	12 4,0	40 13,5	296 100
1983	249	1 0,4	2 0,8	3 1,2	5 2,0	30 12,1	249 100
1984	297	1 0,3	2 0,6	3 0,9	5 1,6	12 4,1	297 100
1985	307	1 0,3	2 0,6	9 2,9	13 4,2	28 9,1	307 100
1986	215	1 0,4	1 0,4	5 2,3	10 4,6	24 11,1	215 100
TOTAL	2597	9 0,3	22 0,8	55 2,1	97 3,7	265 10,2	2597 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	58	7 12,1	15 25,9	28 48,3	58 100
1978	218	20 9,2	38 17,4	70 32,1	218 100
1979	342	31 9,0	71 20,7	105 30,7	342 100
1980	312	61 19,6	96 30,8	146 46,8	312 100
1981	303	28 9,2	68 22,4	162 53,4	303 100
1982	296	35 11,8	89 30,0	188 63,5	296 100
1983	249	41 16,5	88 35,4	153 61,5	249 100
1984	297	31 10,4	74 24,9	137 46,1	297 100
1985	307	26 8,5	50 16,3	115 37,5	307 100
1986	215	27 12,6	58 27,0	104 48,4	215 100
TOTAL	2597	307 11,8	647 24,9	1208 46,5	2597 100

TABLA 26.- Klebsiella spp. % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	58	15 25,9	33 56,9	39 67,2	44 75,8	48 82,7	51 87,9	58 100
1978	218	50 22,9	107 49,0	131 60,0	149 68,3	173 79,3	188 86,2	218 100
1979	342	86 25,1	189 55,2	235 68,6	258 75,4	279 81,5	302 88,3	342 100
1980	312	80 25,6	148 47,7	187 59,9	217 69,5	230 73,7	263 84,4	312 100
1981	303	99 32,7	184 60,7	217 71,6	228 75,3	253 83,5	265 87,5	303 100
1982	296	57 19,3	150 50,7	205 69,3	220 74,4	250 84,5	267 90,2	296 100
1983	249	91 36,6	154 61,9	181 72,8	206 82,8	213 85,6	238 95,6	249 100
1984	297	69 23,2	142 47,8	177 59,6	205 69,1	235 79,2	260 87,6	297 100
1985	307	43 14,0	172 56,0	221 72,0	236 76,9	248 80,8	266 86,7	307 100
1986	215	70 32,6	146 67,9	171 79,5	180 83,7	192 89,3	199 92,6	315 100
TOTAL	2597	660 25,4	1425 54,8	1764 67,9	1943 74,8	2121 81,6	2299 88,4	2597 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	58	30 51,7	36 62,0	39 67,2	41 70,7	43 74,2	48 82,8	52 100
1978	218	107 49,1	127 58,3	142 65,2	153 70,2	162 74,3	175 80,3	218 100
1979	342	190 55,6	225 65,8	252 73,7	266 77,8	274 80,1	291 85,1	342 100
1980	312	145 46,5	170 54,5	189 60,6	203 65,1	219 70,2	255 81,7	312 100
1981	303	153 50,5	191 63,0	219 72,2	239 78,8	254 83,8	271 89,4	303 100
1982	296	160 34,0	197 66,5	224 75,6	237 80,0	242 81,7	258 86,1	296 100
1983	249	142 57,0	168 67,4	191 76,6	199 79,9	207 83,2	219 88,0	249 100
1984	297	143 48,1	180 60,6	193 65,0	204 68,7	208 70,0	218 73,4	297 100
1985	307	182 59,3	207 67,4	229 74,6	244 79,5	252 82,1	265 86,3	307 100
1986	215	144 87,0	165 76,8	188 87,5	196 91,2	197 91,6	201 93,5	215 100
TOTAL	2597	1396 53,8	1666 64,2	1866 71,9	1982 76,4	2058 79,3	2198 84,7	2597 100

TABLA 27.- Klebsiella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	58	71 2,1	33 57,0	50 86,3	53 91,5	55 94,9	56 96,6	58 100
1978	218	18 8,3	112 51,4	183 84,0	192 88,1	199 91,3	205 94,0	218 100
1979	342	26 7,6	182 53,0	288 84,0	306 89,5	320 98,6	325 95,0	342 100
1980	312	30 9,6	178 57,0	282 90,4	287 92,0	295 94,6	300 96,2	312 100
1981	303	441 4,5	190 62,7	258 85,2	279 92,1	288 95,1	290 95,7	303 100
1982	296	441 4,9	176 59,5	268 90,6	284 96,0	287 97,0	289 97,7	296 100
1983	249	381 5,3	175 70,3	224 90,0	236 94,8	243 97,6	246 98,8	249 100
1984	297	17 5,7	151 50,8	256 86,1	269 90,5	279 93,9	283 95,3	297 100
1985	307	18 5,9	165 53,8	292 95,2	298 97,1	302 98,4	304 99,1	307 100
1986	215	20 9,3	122 56,8	196 91,3	207 96,4	209 97,3	211 98,2	215 100
TOTAL	2597	262 10,1	1484 58,1	2297 89,4	2411 93,8	2477 96,4	2509 97,6	2597 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1980	312	286 91,7	308 98,8	309 99,1	310 99,4	312 100		
1981	303	282 93,1	300 99,0	301 99,3	301 99,3	301 99,3	303 100	
1982	296	272 91,9	292 98,7	293 99,0	294 99,3	294 99,3	296 100	
1983	249	230 92,4	245 98,4	247 99,2	248 99,6	248 99,6	249 100	
1984	297	268 90,2	289 97,4	290 97,7	291 98,0	293 98,7	294 99,0	297 100
1985	307	287 93,5	300 97,7	302 98,4	303 98,7	306 99,7	306 99,7	306 99,7
1986	215	195 90,7	213 99,0	214 99,5	215 100			
TOTAL	1979	1820 92,0	1947 98,4	1956 98,8	1962 99,1	1969 99,4	1975 99,7	1978 99,9

TABLA 28.- Klebsiella spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1981	180	95 52,8	180 100					
1982	296	158 53,3	292 98,6	294 99,3	294 99,3	296 100		
1983	249	143 57,4	247 99,2	247 99,2	247 99,2	249 100		
1984	297	144 48,5	284 95,6	291 98,0	293 98,7	295 99,4	296 99,7	297 100
1985	307	130 42,3	295 96,1	303 98,8	305 99,4	306 99,7	307 100	
1986	215	118 54,9	213 99,1	213 99,1	215 100			
TOTAL	1544	788 51,0	1511 97,8	1528 98,9	1534 99,3	1541 99,7	1543 99,9	1544 100

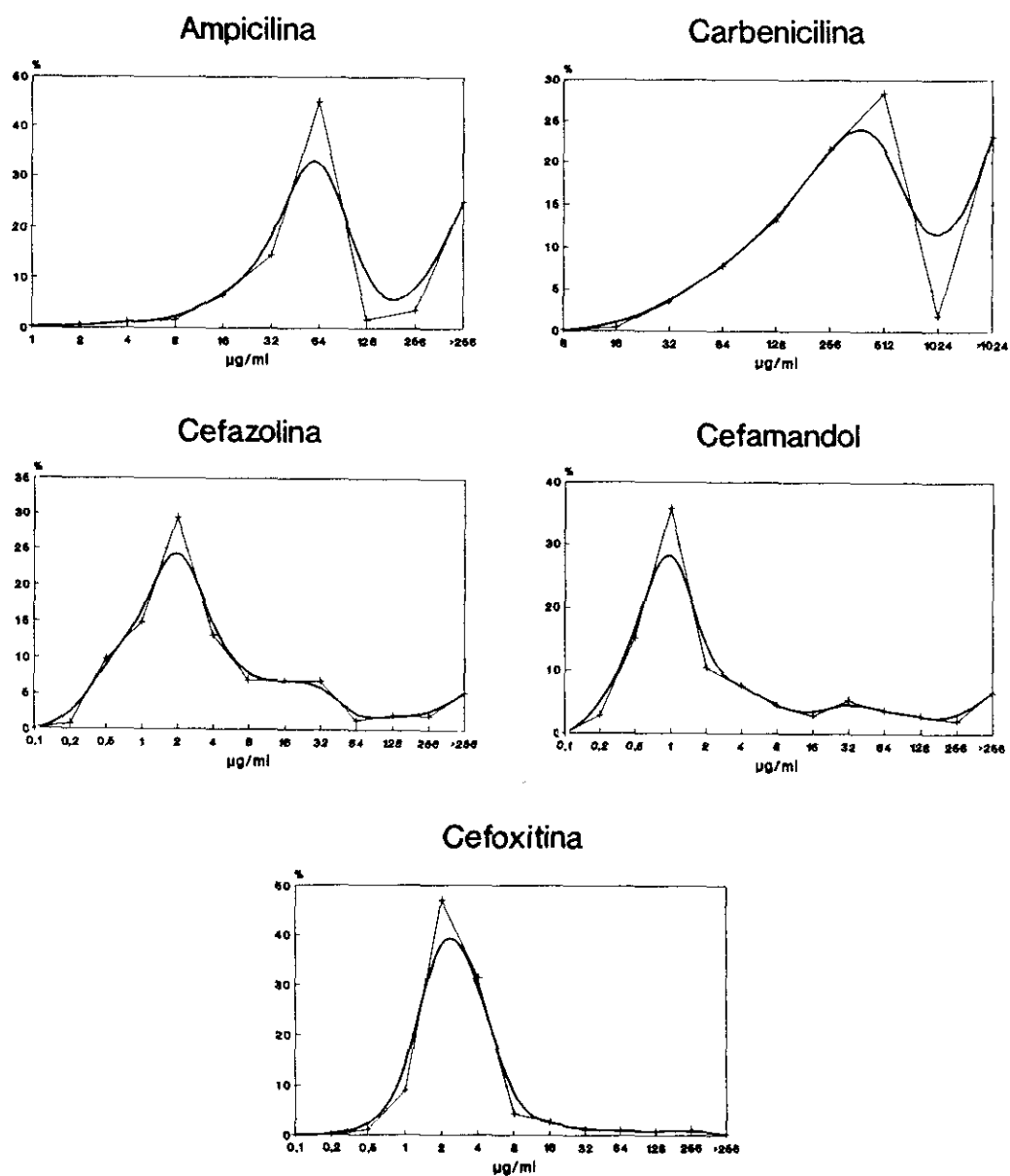
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1983	249	213 85,6	246 98,8	247 99,2	248 99,6	248 99,6	248 99,6	248 99,6
1984	297	252 84,8	283 95,3	286 96,3	287 96,6	289 97,3	291 98,0	295 99,3
1985	307	249 81,2	295 96,2	300 97,8	301 98,1	306 99,7	307 100	
1986	215	180 83,7	213 99,1	215 100				
TOTAL	1068	894 83,7	1037 97,0	1048 98,0	1051 98,3	1058 99,0	1061 99,3	1065 99,7

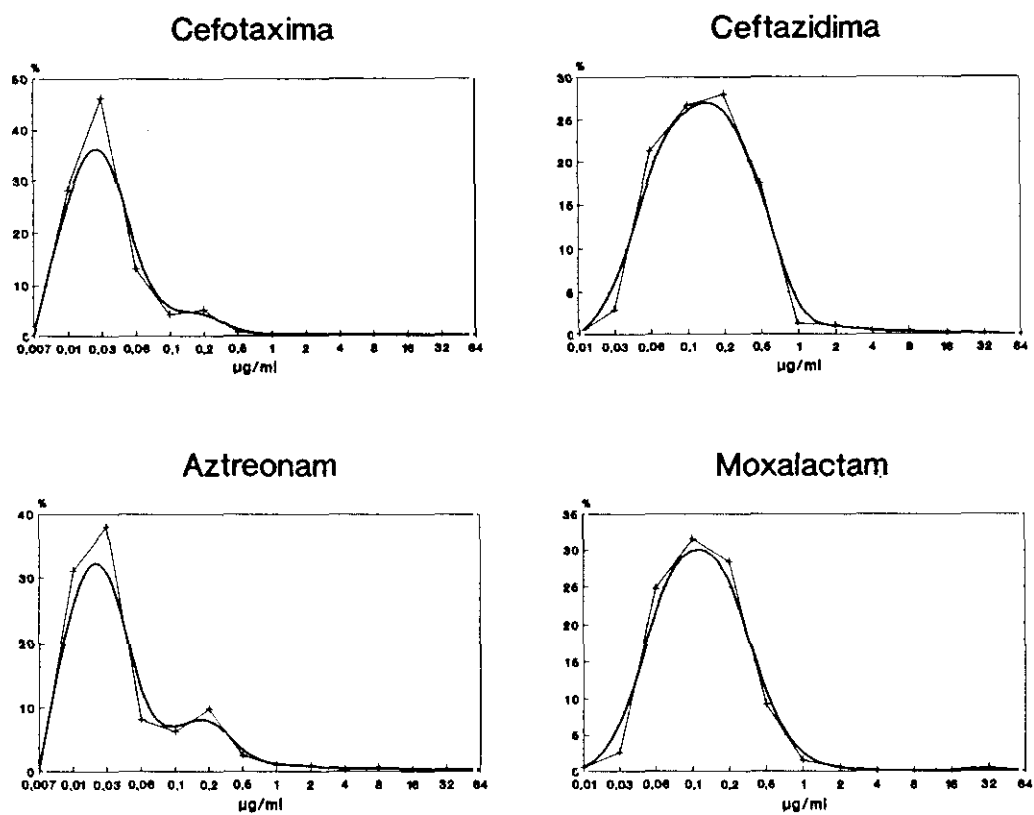
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤0, 1ug/ml	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1980	312	196 62,8	308 98,7	308 98,7	308 98,7	308 98,7	311 99,7	312 100
1981	303	179 59,1	300 99,0	301 99,3	301 99,3	301 99,3	301 99,3	303 100
1982	296	178 60,1	291 98,3	293 99,0	295 98,7	296 100		
1983	249	140 56,2	245 98,4	247 99,2	247 99,2	247 99,2	248 99,6	248 99,6
1984	297	202 68,1	288 97,0	290 97,7	290 97,7	291 98,0	291 98,0	296 99,7
1985	307	162 52,8	302 98,4	303 98,7	303 98,7	303 98,7	304 99,0	306 99,7
1986	215	118 54,9	214 99,5	215 100				
TOTAL	1979	1175 59,4	1948 98,5	1957 99,0	1959 99,1	1961 99,2	1966 99,4	1976 99,5

6.2 Klebsiella spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 12.



6.2 Klebsiella spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 13.



6.3 Klebsiella spp: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 29A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	32 Grado	64	30,53	32	81,18	169,4	>64
Carbenicilina	32 Grado	512	154,3	128	480,03	1172,2	>512
Cefazolina	32 Grado	2	1,43	2	8,76	16,80	16
Cefamandol	32 Grado	1	1,18	1	11,12	18,56	16
Cefoxitina	32 Grado	2	2,15	2	17,66	15,28	16
Cefotaxima	32 Grado	0,03	0,03	0,03	0,33	0,21	0,2
Ceftazidima	32 Grado	0,2	0,16	0,2	1,14	1,02	1
Aztreonam	32 Grado	0,03	0,03	0,03	0,20	0,19	0,2
Moxalactam	32 Grado	0,1	0,18	0,2	1,36	0,91	1

6.4 Klebsiella spp: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 29B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
NO	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	10,2%	3,7%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	68,3%	71,7%
3	R	R	S	R	S	S	S	S	S	2,5%	2,6%
4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	13,7%	13,5%
5	R	R	R	R	R	S	S	S	S	<1%	<1%
6	R	R	R	R	S	S	S	R	S	1,4%	--
7	R	R	R	R	S	R	R	R	S	1,6%	--
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	<1%	<1%
9	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1,4%	6,9%
10	R	S	R	S	S	S	S	S	S	<1%	<1%
11	R	S	R	R	R	S	S	S	S	<1%	<1%
12	R	S	R	R	R	R	R	R	R	<1%	<1%

6.5 Klebsiella spp: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 29C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Cefazolina	2 ug/ml	+ 0,39071
	32 ug/ml	+ 0,43873
Cefotaxima	≤0,1 ug/ml	- 0,25112
	≤1 ug/ml	- 0,39808
Ceftazidima	≤0,1 ug/ml	- 0,31174
	≤1 ug/ml	----

7.- *Yersinia enterocolitica*

7.1 *Yersinia enterocolitica*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas. TABLA 30.

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	3			2	3
1978	10		1 10,0	8 80,0	10 100
1979	14	1 6,7	2 14,3	11 78,6	14 100
1980	15	1 6,7	4 26,7	11 73,3	15 100
1981	9		1	8	9
1982	10			8 80,0	10 100
1983	10		1 10,0	8 80,0	10 100
1984	11		1 9,1	10 90,9	11 100
1985	13		1 7,7	10 76,9	13 100
1986	8		1	7	8
TOTAL	103	1 1,0	12 11,7	83 80,6	103 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1977	3		1	3	
1978	10		4 40,0	10 100	
1979	14		3 21,4	12 85,7	14 100
1980	15	1 6,7	5 33,3	14 93,3	15 100
1981	9		3	8	9
1982	10		4 40,0	9 90,0	10 100
1983	10		2 20,0	10 100	
1984	11		3 27,3	10 90,9	11 100
1985	13		5 38,5	13 100	
1986	8	1	3	8	
TOTAL	103	2 1,9	33 32,0	97 94,2	103 100

TABLA 31.- Y. enterocolitica: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTIXIMA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml
1977	3			3	
1978	10		4 40,0	10 100	
1979	14		4 28,6	13 92,9	14 100
1980	15		5 33,3	14 93,3	15 100
1981	9		3	9	
1982	10		3 30,0	9 90,0	10 100
1983	10		2 20,0	9 90,0	10 100
1984	11		2 18,2	9 81,8	11 100
1985	13	1 7,7	5 38,5	13 100	
1986	8		3	8	
TOTAL	103	1 1,0	31 30,1	97 94,2	103 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1980	15	13 86,7	15 100
1981	9	9	
1982	10	9 90,0	10 100
1983	10	8 80,0	10 100
1984	11	10 90,0	11 100
1985	13	11 84,4	13 100
1986	8	8	
TOTAL	76	68 89,5	76 100

TABLA 32.- Y. enterocolitica: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.

ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1981	5	4	5
1982	10	9 90,0	10 100
1983	10	8 80,0	10 100
1984	11	9 81,8	11 100
1985	13	11 84,6	13 100
1986	8	7	8
TOTAL	57	48 84,2	57 100

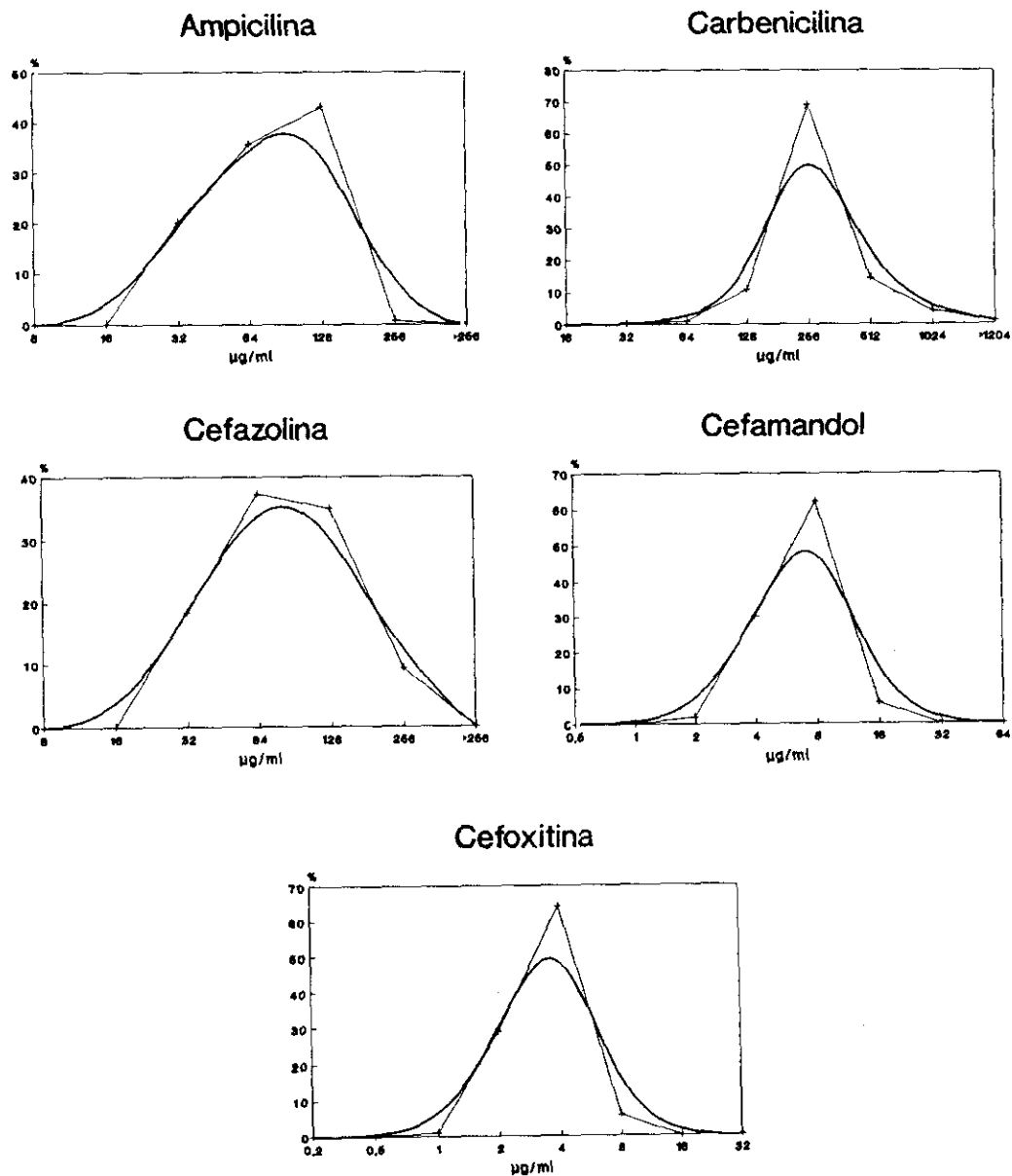
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1983	10	7 70,0	10 100
1984	11	8 72,7	11 100
1985	13	8 61,5	13 100
1986	8	6	8
TOTAL	42	29 69,0	42 100

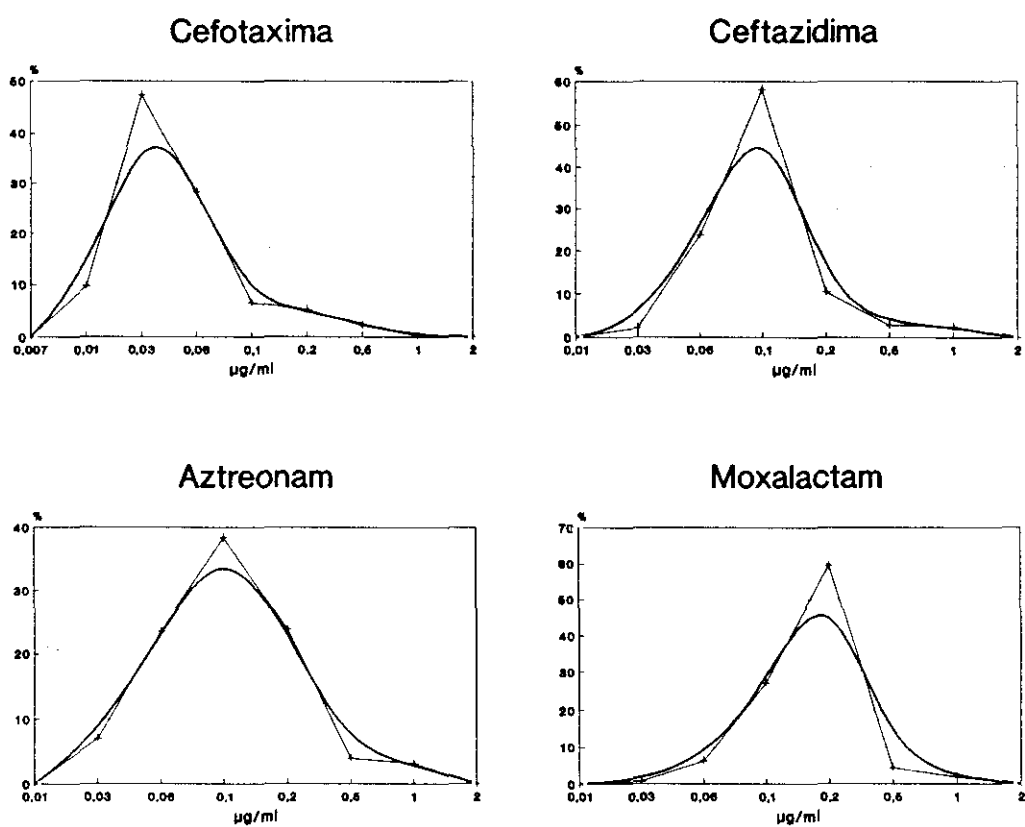
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1980	15	6 40,0	15 100
1981	9	3	9
1982	10	2 20,0	10 100
1983	10	3 30,0	10 100
1984	11	4 36,4	11 100
1985	13	5 38,5	13 100
1986	8	3	9
TOTAL	76	26 34,2	76 100

7.2 *Yersinia enterocolitica*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 14.



7.2 *Yersinia enterocolitica*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 15.



7.3 Yersinia enterocolitica: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 33A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	20 Grado	128	83,28	64	-	136,5	128
Carbenicilina	20 Grado	256	321,7	256	-	799,5	512
Cefazolina	20 Grado	64	86,22	64	-	179,7	128
Cefamandol	20 Grado	8	6,02	8	-	14,5	16
Cefoxitina	20 Grado	4	3,03	4	-	10,9	8
Cefotaxima	20 Grado	0,06	0,06	0,06	-	0,2	0,2
Ceftazidima	20 Grado	0,1	0,12	0,1	-	0,3	0,5
Aztreonam	20 Grado	0,1	0,12	0,1	-	0,2	0,2
Moxalactam	20 Grado	0,2	0,16	0,2	-	0,4	0,5

7.4 Yersinia enterocolitica: Fenotipos de sensibilidad microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 33B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	56,1%	--
2	R	R	R	S	S	S	S	S	S	41,9%	100%
3	R	S	R	S	S	R	R	R	R	2,0%	--

7.5 Yersinia enterocolitica: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 33C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)	
Cefamandol	8 ug/ml	-	0,01698
	16 ug/ml	-	0,01698
Cefoxitina	4 ug/ml	+	0,30317
	8 ug/ml	+	0,30317
Cefotaxima	≤0,1 ug/ml	+	0,10246
	≤1 ug/ml	+	0,10246

8.- *Proteus vulgaris*

8.1 *Proteus vulgaris*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.
TABLA 34.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	< 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	8	1	1	1	1	2	8
1978	25			1 4,0	1 4,0	1 4,0	25 100
1979	32		1 3,1	1 3,1	1 3,1	3 9,3	32 100
1980	23						23 100
1981	19					1 5,3	19 100
1982	40	1 2,5	1 2,5	3 7,5	4 0,01	6 15,0	40 100
1983	50	3 6,0	3 6,0	4 8,0	4 8,0	7 14,0	50 100
1984	33	1 3,0	2 6,0	2 6,0	3 9,0	4 12,0	33 100
1985	79	3 3,8	5 6,3	5 6,3	7 8,8	14 17,7	79 100
1986	19		1 3,4	1 3,4	2 6,8	4 13,7	29 100
TOTAL	338	9 2,7	14 4,2	18 5,4	23 6,9	42 12,5	338 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	<64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	8	7	7	7	8
1978	25	22 88,0	22 88,0	22 88,0	25 100
1979	32	28 87,5	28 87,5	29 90,6	32 100
1980	23	20 86,9	20 86,9	21 91,3	23 100
1981	19	17 89,5	17 89,5	17 89,5	19 100
1982	40	35 87,5	35 87,5	36 90,0	40 100
1983	50	43 86,0	44 88,0	45 90,0	50 100
1984	33	28 84,9	29 87,9	30 90,9	33 100
1985	79	70 88,6	71 89,9	73 92,5	79 100
1986	29	26 89,7	26 89,7	26 89,7	29 100
TOTAL	338	296 87,6	299 88,5	306 90,6	338 100

TABLA 35.- P. vulgaris: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	8	1	1	1	2	2	3	8
1978	25		1 4,0	1 4,0	1 4,0	2 8,0	3 12,0	25 100
1979	32	1 3,1	1 3,1	2 6,2	3 9,3	3 9,3	4 12,4	32 100
1980	23				1 4,3	1 4,3	2 8,6	23 100
1981	19			1 5,3	1 5,3	1 5,3	3 15,8	19 100
1982	40			3 7,5	5 12,5	6 15,0	6 15,0	40 100
1983	50	1 2,0	1 2,0	6 12,0	7 14,0	7 14,0	8 16,0	50 100
1984	33	1 3,0	2 6,0	5 15,1	6 18,1	8 24,2	8 24,2	33 100
1985	79		1 1,3	8 10,2	8 10,2	8 10,2	16 20,3	79 100
1986	29			1 3,5	2 7,0	4 13,9	6 20,8	29 100
TOTAL	338	4 1,2	7 2,1	28 8,3	36 10,7	42 12,5	59 17,5	338 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	8	1	1	1	2	2	2	8
1978	25	1 4,0	1 4,0	4 16,0	4 16,0	6 24,0	7 28,0	25 100
1979	32		2 6,2	6 18,7	8 24,9	9 28,0	9 28,0	32 100
1980	23	1 4,3	1 4,3	4 17,4	4 17,4	4 17,4	7 30,5	23 100
1981	19	1 5,3	2 10,6	3 15,9	4 21,2	6 31,6	6 31,6	19 100
1982	40	3 7,5	5 12,5	9 22,5	9 22,5	10 25,0	15 37,5	40 100
1983	50	2 4,0	4 8,0	9 18,0	11 22,0	14 28,0	17 34,0	50 100
1984	33	3 9,1	5 15,2	9 17,3	10 20,3	11 23,3	13 24,4	33 100
1985	79	4 5,1	11 14,0	16 20,3	20 25,4	23 29,2	30 38,0	79 100
1986	29	1 3,4	3 10,3	5 17,2	7 24,1	9 31,0	11 37,9	29 100
TOTAL	338	17 5,0	35 10,3	66 19,5	79 23,3	94 27,8	117 34,6	338 100

TABLA 36.- P. vulgaris: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1977	8		1	6	7	8		
1978	25	1 4,0	6 24,0	19 76,0	22 88,0	25 100		
1979	32	1 3,1	4 12,5	19 59,4	24 75,0	27 84,4	31 96,9	32 100
1980	23		4 17,4	16 69,6	20 87,0	22 95,7	23 100	
1981	19	1 5,2	5 26,2	14 73,6	16 84,2	18 94,8	19 100	
1982	40	2 5,0	8 20,0	28 70,0	33 82,5	38 95,0	40 100	
1983	50	1 2,0	10 20,0	36 72,0	44 88,0	49 98,0	50 100	
1984	33	2 6,1	6 18,2	27 81,8	30 90,9	32 97,0	32 97,0	33 100
1985	79	1 1,3	16 20,3	62 78,5	74 93,7	79 100		
1986	29	1 3,4	5 17,2	20 69,0	27 93,2	28 96,6	28 96,6	29 100
TOTAL	338	10 2,9	65 19,2	247 73,0	297 87,8	326 96,4	335 99,1	338 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml
1980	23	20 86,9	22 95,6	23 100		
1981	19	18 94,7	19 100			
1982	40	37 92,5	39 97,5	40 100		
1983	50	47 94,0	50 100			
1984	33	29 87,9	31 94,0	32 97,0	32 97,0	33 100
1985	79	75 94,9	79 100			
1986	29	25 86,2	27 93,1	29 100		
TOTAL	273	251 91,9	267 97,8	272 99,6	272 99,6	273 100

TABLA 37.- P. vulgaris: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml
1981	10	9	10				
1982	40	37 92,5	40 100				
1983	50	46 92,0	50 100				
1984	33	29 87,9	32 97,0	32 97,0	32 97,0	32 97,0	33 100
1985	79	76 96,2	79 100				
1986	29	24 82,8	27 93,1	27 93,1	29 100		
TOTAL	241	221 91,7	238 98,8	238 98,8	240 99,6	240 99,6	241 100

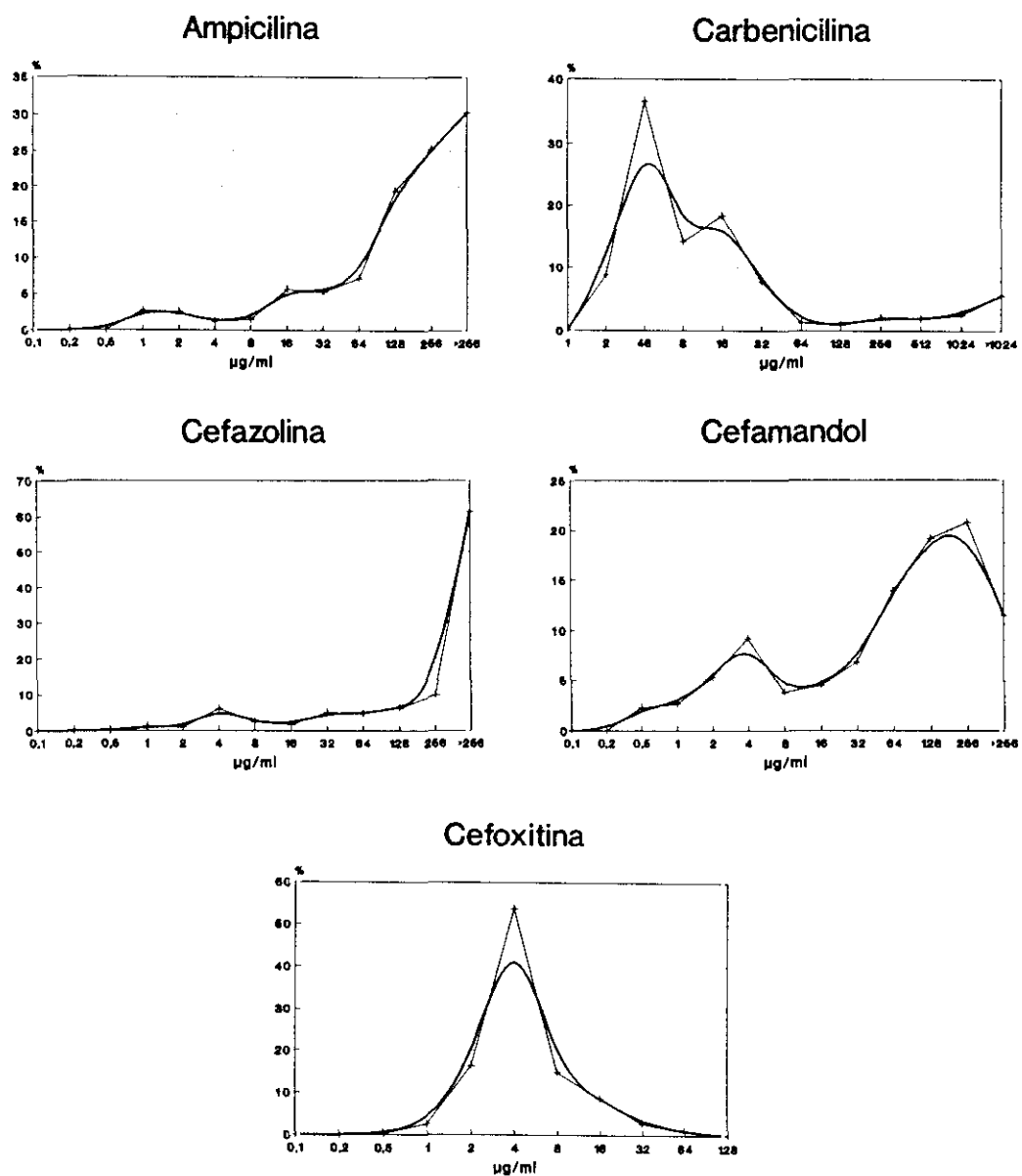
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml
1983	50	47 94,0	50 100	
1984	33	30 90,9	31 93,9	33 100
1985	79	77 97,5	79 100	
1986	29	26 89,6	28 96,5	29 100
TOTAL	191	180 94,2	188 98,4	191 100

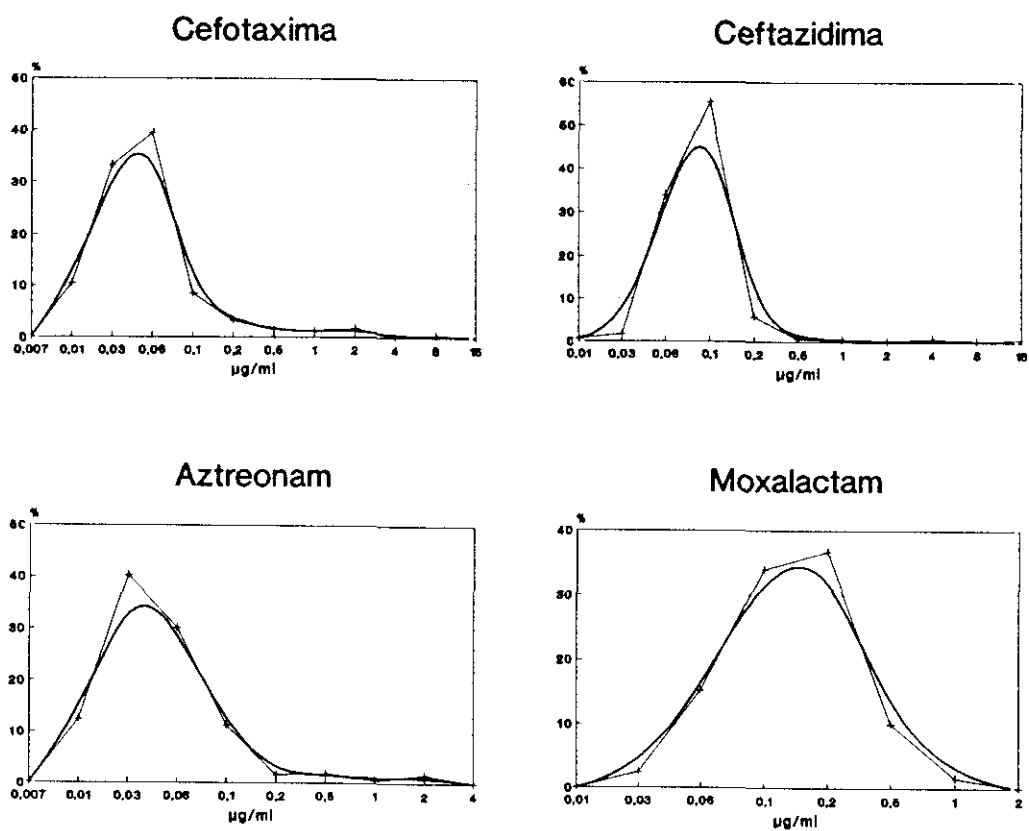
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml
1980	23	12 52,2	23 100
1981	19	10 52,6	19 100
1982	40	20 50,0	40 100
1983	50	27 54,0	50 100
1984	33	17 51,5	33 100
1985	79	39 49,4	79 100
1986	29	16 55,2	29 100
TOTAL	273	141 51,6	273 100

8.2 *Proteus vulgaris*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 16.



8.2 *Proteus vulgaris*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 17.



8.3 Proteus vulgaris: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 38A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	3Q Grado	1	0,61	1	1,16	1,74	2
Carbenicilina	3Q Grado	4	6,47	8	32,50	27,60	32
Cefazolina	3Q Grado	4	1,28	1	3,38	2,70	4
Cefamandol	3Q Grado	4	0,23	1	2,42	2,34	4
Cefoxitina	2Q Grado	4	4,29	4	-	16,68	16
Cefotaxima	3Q Grado	0,06	0,04	0,06	0,31	0,24	0,2
Ceftazidima	3Q Grado	0,1	0,09	0,1	0,66	0,44	0,5
Aztreonam	3Q Grado	0,03	0,50	0,06	0,21	0,20	0,2
Moxalactam	2Q Grado	0,2	0,15	0,2	-	0,40	0,5

8.4 Proteus vulgaris: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 38B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4,2%	6,9%
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	<1%	<1%
3	R	R	R	R	S	S	S	S	S	8,4%	11,1%
4	R	R	R	R	R	S	S	S	S	<1%	<1%
5	R	R	R	R	S	R	S	R	S	2,8%	--
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1,1%	--
7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	3,7%	8,7%
8	R	S	R	S	S	S	S	S	S	8,9	7,6%
9	R	S	R	R	S	S	S	S	S	67,5%	63,1%
10	R	S	R	S	R	S	S	S	S	1,2%	1,3%
11	R	S	R	R	R	R	R	R	R	<1%	--

8.5 Proteus vulgaris: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 38C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Carbenicilina	<64 ug/ml	+ 0,07594
	>256 ug/ml	+ 0,05789
Cefoxitina	4 ug/ml	+ 0,86805
	16 ug/ml	+ 0,22631
Cefotaxima	>0,1 ug/ml	- 0,12577
	<1 ug/ml	- 0,28457

9.- *Enterobacter spp.*

9.1 Enterobacter spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.TABLA 39.ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	43	1 2,3	1 2,3	3 7,0	9 20,9	14 32,5	43 100
1978	123		2 1,6	6 4,8	20 16,2	30 24,4	123 100
1979	164	1 0,6	2 1,2	6 3,7	18 11,0	30 18,3	164 100
1980	150		2 1,3	6 3,9	16 10,6	29 19,3	150 100
1981	168	2 1,2	4 2,4	7 4,2	21 12,5	38 22,6	168 100
1982	215	4 1,9	12 5,6	22 10,2	53 24,6	85 39,5	215 100
1983	208	1 0,5	3 1,4	9 4,3	26 12,5	54 26,0	208 100
1984	186	1 0,5	1 0,5	2 1,0	16 8,5	38 20,4	186 100
1985	179	2 1,1	3 1,7	13 7,3	40 22,4	81 45,3	179 100
1986	181		2 1,1	10 5,5	28 15,4	55 30,3	181 100
<u>TOTAL</u>	1617	12 0,7	32 1,9	84 5,2	247 15,3	454 28,1	1617 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	>256 ug/ml
1977	43	35 81,4	36 83,7	37 86,0	43 100
1978	123	95 77,3	97 78,9	100 81,3	123 100
1979	164	108 65,8	111 67,6	115 70,0	164 100
1980	150	103 68,7	105 70,0	107 71,3	150 100
1981	168	119 70,8	122 72,6	126 75,0	168 100
1982	215	180 83,7	190 88,4	196 91,2	215 100
1983	208	164 78,8	174 83,6	185 88,9	208 100
1984	186	140 75,3	148 79,6	151 81,2	186 100
1985	179	156 87,1	160 89,3	166 92,7	179 100
1986	181	144 79,6	149 82,4	157 86,8	181 100
<u>TOTAL</u>	1617	1244 76,9	1292 79,9	1340 82,9	1617 100

TABLA 40.- Enterobacter spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	43		1 2,3	4 9,3	6 13,9	8 18,5	9 20,8	43 100
1978	123	1 0,8	6 4,9	11 9,0	16 13,1	24 19,6	28 22,8	123 100
1979	164	2 1,2	5 3,0	8 4,8	12 7,2	17 10,2	24 14,5	164 100
1980	150	1 0,7	2 1,4	6 4,1	9 6,1	13 8,8	19 12,8	150 100
1981	168	2 1,1	3 1,7	9 5,3	14 8,3	20 11,9	30 17,9	168 100
1982	215	6 2,8	9 4,2	26 12,1	36 16,7	45 20,9	54 25,1	215 100
1983	208	9 4,3	15 7,2	24 11,5	26 12,5	34 16,3	42 20,1	208 100
1984	186	2 1,1	6 3,3	11 6,0	14 7,6	19 10,3	28 15,1	186 100
1985	179	2 1,1	7 3,9	14 7,8	19 10,6	27 15,1	35 19,6	179 100
1986	181	3 1,6	8 4,4	13 7,2	18 10,0	23 12,8	28 15,6	181 100
TOTAL	1617	28 1,7	62 3,8	126 7,7	170 10,4	230 14,2	297 18,3	1617 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	43	11 25,6	23 53,5	29 67,4	32 74,4	34 79,1	35 81,4	43 100
1978	123	29 23,6	59 48,0	82 66,7	87 70,8	93 75,7	96 78,1	123 100
1979	164	35 21,3	78 47,6	109 66,5	115 70,1	125 76,2	130 79,3	164 100
1980	150	31 20,7	69 46,0	95 63,3	104 69,3	112 74,7	115 76,7	150 100
1981	168	42 25,0	88 52,4	116 69,1	124 73,9	126 75,0	133 79,2	168 100
1982	215	79 36,7	144 67,0	174 80,9	184 85,5	186 86,4	189 87,9	215 100
1983	208	77 37,0	120 57,7	157 75,5	162 77,9	170 81,7	175 84,1	208 100
1984	186	57 30,6	106 56,9	126 67,6	138 74,1	146 78,4	152 81,7	186 100
1985	179	65 36,3	133 74,3	146 81,6	150 83,8	155 86,6	158 88,3	179 100
1986	181	41 22,6	101 55,7	129 71,2	138 76,2	144 79,5	149 82,3	181 100
TOTAL	1617	467 28,9	921 57,0	1163 72,0	1234 76,4	1291 79,9	1332 82,4	1617 100

TABLA 41.- *Enterobacter* spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.

ANTIBIOTICO: CEFORTINA.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	43	1 2,3	1 2,3	2 4,6	4 9,3	6 14,0	7 16,3	43 100
1978	123	1 0,8	2 1,6	5 4,0	8 6,4	10 8,1	13 10,6	123 100
1979	164	1 0,6	3 1,9	9 5,5	11 6,8	14 8,6	20 12,2	164 100
1980	150		2 1,4	6 4,0	7 4,7	9 6,1	13 8,7	150 100
1981	168		3 1,8	5 3,0	8 4,8	12 7,2	17 10,2	168 100
1982	215	5 2,3	13 6,0	29 13,5	36 16,7	42 19,5	48 22,3	215 100
1983	208	5 2,4	7 3,4	17 8,2	24 11,6	29 14,0	44 21,2	208 100
1984	186	4 2,1	5 2,7	11 5,9	13 7,0	17 9,2	20 10,8	186 100
1985	179	1 0,6	5 2,8	10 5,5	14 7,7	17 9,5	29 16,2	179 100
1986	181	2 1,1	7 3,9	14 7,8	16 8,9	17 9,4	20 11,1	181 100
TOTAL	1617	20 1,2	48 2,9	108 6,6	141 8,7	173 10,7	231 14,3	1617 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>32 ug/ml
1980	150	67 44,7	128 85,4	129 86,0	133 88,7	142 94,7	145 96,7	149 99,4
1981	168	63 37,5	145 86,3	147 87,5	149 88,7	154 91,7	159 94,7	166 98,8
1982	215	114 53,0	192 89,2	193 89,7	199 92,5	201 93,4	205 95,3	211 98,1
1983	208	118 56,7	186 89,4	187 89,9	187 89,9	187 89,9	187 89,9	196 94,2
1984	186	85 45,8	163 87,7	166 89,3	170 91,4	174 93,5	176 94,7	180 96,8
1985	179	110 61,4	161 89,9	163 91,0	165 92,1	169 94,3	171 95,4	173 96,5
1986	181	73 40,3	153 84,6	153 84,6	154 85,2	154 85,2	157 86,8	161 89,0
TOTAL	1287	630 48,9	1128 87,6	1138 88,4	1157 89,9	1181 91,8	1200 93,3	1236 96,1

TABLA 42.- Enterobacter spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1981	108	28 25,9	89 82,4	90 83,3	94 87,0	101 93,5	104 96,3	107 99,1
1982	215	79 36,7	180 88,3	193 89,7	200 92,9	203 94,3	208 96,7	210 97,6
1983	208	70 33,6	185 88,9	187 89,8	188 90,3	189 90,8	190 91,3	194 93,2
1984	186	50 26,9	162 87,2	165 88,8	171 92,0	172 92,2	175 94,1	181 97,3
1985	179	50 27,9	161 89,9	162 90,5	168 93,8	169 94,4	172 96,1	173 96,7
1986	181	35 19,3	155 85,6	155 85,6	157 86,7	160 88,3	161 88,9	165 91,2
TOTAL	1077	312 28,9	942 87,5	952 88,4	978 90,8	994 92,3	1010 93,8	1030 95,6

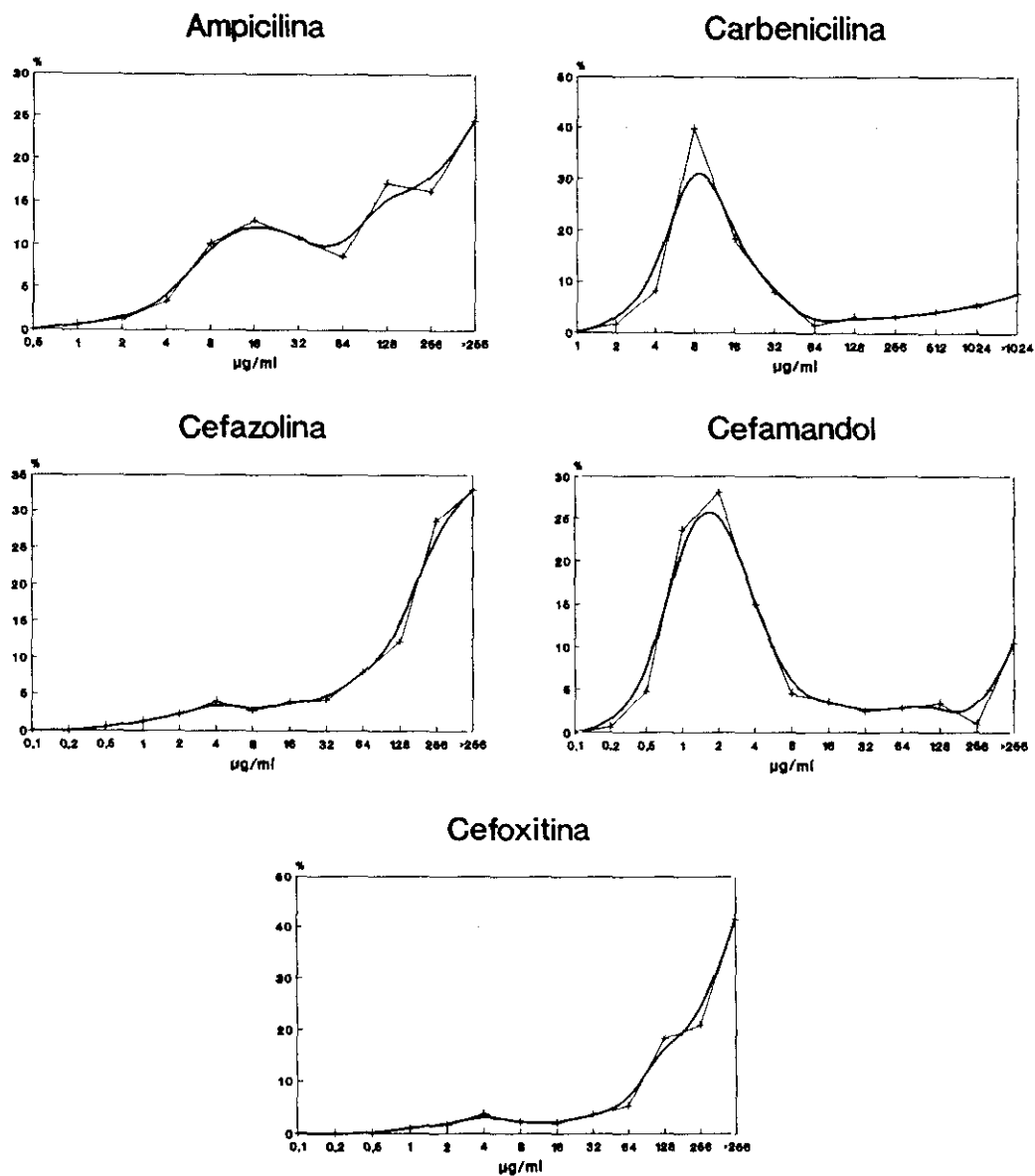
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1983	208	156 75,0	186 89,4	188 90,4	191 91,8	192 92,3	194 93,3	204 98,1
1984	186	147 79,0	167 89,7	171 91,8	174 93,4	175 94,0	180 96,8	186 100
1985	179	139 76,8	168 93,0	169 93,6	169 93,6	170 94,2	171 94,8	177 98,2
1986	181	124 68,5	153 84,5	153 84,5	155 85,6	158 87,2	160 88,3	168 92,8
TOTAL	754	566 75,1	674 89,4	681 90,3	689 91,4	695 92,2	705 93,5	735 97,5

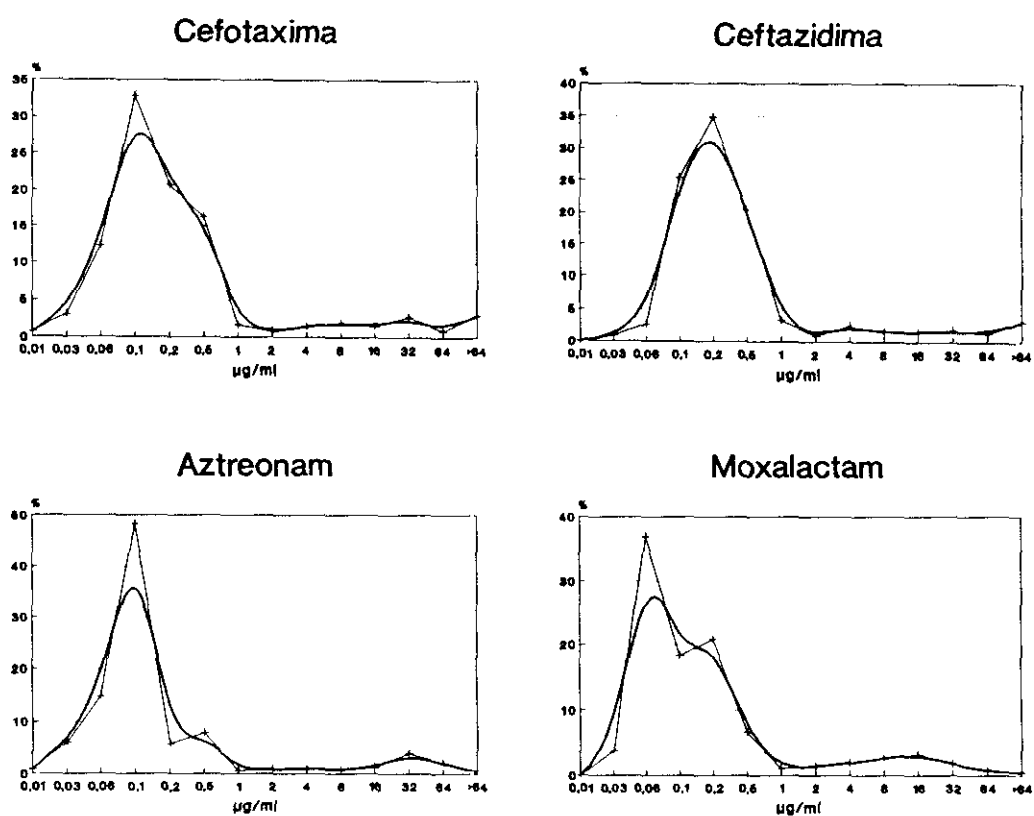
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	150	89 59,3	130 86,6	132 87,9	136 90,6	140 93,3	146 97,3	149 99,3
1981	168	104 61,9	146 86,9	147 87,5	150 89,3	154 91,7	162 96,4	167 99,4
1982	215	124 57,7	191 88,9	196 91,2	203 94,4	207 96,3	211 98,2	212 98,6
1983	208	114 55,8	183 88,0	185 89,0	198 90,4	196 94,2	201 96,6	207 99,5
1984	186	122 65,6	165 88,7	170 91,4	173 93,0	180 96,8	182 97,9	185 99,5
1985	179	110 61,4	161 89,9	162 90,5	162 90,5	166 92,7	175 97,7	178 99,4
1986	181	96 53,0	153 84,5	155 85,6	160 88,4	164 90,6	172 95,0	174 96,1
TOTAL	1287	759 59,0	1129 87,7	1147 89,1	1172 91,0	1207 93,7	1249 97,0	1272 98,8

9.2 Enterobacter spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 18.



9.2 *Enterobacter* spp: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 19.



9.3 Enterobacter spp: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 43A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	32 Grado 16-	256	24,9	16	30,36	33,71	32
Carbenicilina	32 Grado	8	6,73	8	53,26	97,38	64
Cefazolina	32 Grado 4-	256	1,68	2	2,82	4,20	4
Cefamandol	32 Grado	2	1,38	1	11,51	20,94	16
Cefoxitina	32 Grado 4-	256	2,13	2	4,81	9,17	8
Cefotaxima	32 Grado	0,1	0,16	0,2	1,90	1,82	2
Ceftazidima	32 Grado	0,2	0,20	0,2	2,25	2,34	2
Aztreonam	32 Grado	0,1	0,11	0,1	1,52	1,28	1
Moxalactam	32 Grado	0,06	0,13	0,1	1,72	1,53	2

9.4 Enterobacter spp: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 43B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
NO	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	7,7%	10,7%
2	S	S	R	S	R	S	S	S	S	31,2%	4,6%
3	R	R	S	S	R	S	S	S	S	--	3,4%
4	R	R	R	S	S	S	S	S	S	1,0%	--
5	R	R	R	S	R	S	S	S	S	12,8%	12,6%
6	R	R	R	R	R	S	S	S	S	4,9%	4,4%
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4,4%	2,7%
8	R	S	R	S	R	S	S	S	S	27,2%	48,6%
9	R	S	R	R	R	S	S	S	S	4,0%	9,2%
10	R	S	R	R	R	R	R	R	R	6,8%	3,8%

9.5 Enterobacter spp: Evolución de la sensibilidad antibióticos betalactámicos. TABLA 43C.

Antimicrobiano	Concentración	Coefficiente de correlación (r)
Carbenicilina	≤64 ug/ml	+ 0,38819
	>256 ug/ml	- 0,47946
Cefamandol	≤1 ug/ml	- 0,46883
	16 ug/ml	- 0,51676
Cefotaxima	≤0,1 ug/ml	- 0,24042
	2 ug/ml	- 0,07964

10.- *Citrobacter freundii*

10.1 *Citrobacter freundii*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.
TABLA 44.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	13			1 7,7	2 15,4	4 30,8	13 100
1978	50			2 4,0	6 12,0	10 20,0	50 100
1979	61			1 1,6	6 9,8	12 19,6	61 100
1980	40			2 5,0	5 12,5	10 25,0	40 100
1981	28			1 3,6	4 14,3	8 28,6	28 100
1982	58	1 1,7	2 3,4	6 10,3	10 17,2	18 41,0	58 100
1983	56			2 3,6	7 12,5	12 21,4	56 100
1984	70		1 1,4	2 2,8	4 5,7	9 12,9	70 100
1985	63	1 1,6	2 3,2	9 14,3	15 23,8	25 39,7	63 100
1986	30			1 3,3	3 10,0	8 26,7	30 100
TOTAL	469	2 0,4	5 1,0	27 5,7	62 13,2	116 24,7	469 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	13	9 69,2	10 76,9	10 76,9	13 100
1978	50	35 70,0	38 76,0	40 80,0	50 100
1979	61	37 60,6	42 68,8	46 75,4	61 100
1980	40	29 72,5	31 77,5	31 77,5	40 100
1981	28	18 64,3	20 71,4	22 78,5	28 100
1982	58	43 74,1	46 79,3	48 82,8	58 100
1983	56	38 67,9	42 75,0	44 78,6	56 100
1984	70	45 64,3	52 74,3	55 78,6	70 100
1985	63	47 74,6	50 79,4	53 84,2	63 100
1986	30	23 76,7	24 80,0	25 83,3	30 100
TOTAL	469	324 69,1	355 75,7	374 79,7	469 100

TABLA 45.- Citrobacter spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	13		1 7,7	2 15,4	2 15,4	3 23,1	5 38,5	13 100
1978	50	1 2,0	2 4,0	5 10,0	6 12,0	10 20,0	15 80,0	50 100
1979	61	2 3,3	3 5,0	5 8,3	7 11,6	12 19,8	16 26,9	61 100
1980	40	1 2,5	1 2,5	3 7,5	6 15,0	10 25,0	12 30,0	40 100
1981	28	2 7,1	3 10,7	5 17,8	8 28,5	10 35,6	11 38,2	28 100
1982	58	3 5,2	7 12,1	13 22,4	15 25,9	20 34,5	27 46,6	58 100
1983	56	1 1,8	2 3,6	3 5,4	5 9,0	10 17,9	19 34,0	56 100
1984	70	2 2,9	3 4,3	6 8,6	8 11,5	12 17,3	17 24,3	70 100
1985	66	1 1,6	6 9,5	9 14,3	13 20,6	24 38,1	34 54,0	63 100
1986	30	1 3,3	3 10,0	4 13,3	5 16,6	7 23,2	9 30,0	30 100
TOTAL	469	14 3,0	31 6,6	55 11,7	75 16,0	118 25,3	165 35,2	469 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	13	7 53,8	8 61,5	10 76,9	10 76,9	11 84,6	11 84,6	13 100
1978	50	23 46,0	30 60,0	35 70,0	36 72,0	39 78,0	40 80,0	50 100
1979	61	32 52,5	40 65,0	45 73,8	46 75,4	48 78,7	48 78,7	61 100
1980	40	22 55,0	27 67,5	33 82,5	34 85,0	34 85,0	34 85,0	40 100
1981	28	15 53,6	18 55,4	20 62,5	20 62,5	22 68,6	24 76,7	28 100
1982	58	35 60,3	39 67,2	46 79,3	48 82,8	50 86,3	51 88,0	58 100
1983	56	31 55,4	38 67,9	39 69,7	40 71,5	44 78,5	47 83,9	56 100
1984	70	32 45,7	38 54,3	46 65,7	49 70,0	50 71,4	51 72,8	70 100
1985	63	41 65,1	48 76,2	51 81,0	51 81,0	52 82,5	52 82,5	63 100
1986	30	17 56,7	22 73,4	23 76,7	23 76,7	23 76,7	24 80,0	30 100
TOTAL	469	255 54,4	308 65,7	348 74,2	357 76,1	373 79,5	382 81,4	469 100

TABLA 46.- Citrobacter spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	13		1 7,7	2 15,4	3 23,1	4 30,8	4 30,8	13 100
1978	50	1 2,0	2 4,0	5 10,0	5 10,0	8 16,0	10 20,0	50 100
1979	61	1 1,6	1 1,6	5 8,2	6 9,8	8 13,1	11 11,8	61 100
1980	40		1 2,5	3 7,5	5 12,5	6 15,0	6 15,0	40 100
1981	28	1 3,6	1 3,6	4 14,3	7 24,9	9 32,1	10 35,7	28 100
1982	58	2 3,5	7 12,1	15 25,9	18 31,0	19 32,7	22 37,9	58 100
1983	56	1 1,8	3 5,4	7 12,5	8 14,3	10 17,9	11 19,7	56 100
1984	70	1 1,4	4 5,7	7 10,0	8 11,4	9 12,8	10 14,2	70 100
1985	63	1 1,6	5 7,9	12 19,0	14 22,2	16 25,4	21 33,3	66 100
1986	30		2 6,7	5 16,7	5 16,7	6 20,0	7 23,3	30 100
TOTAL	469	8 1,7	27 5,8	65 13,9	79 16,9	95 20,3	112 23,9	469 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	40	28 70,0	40 100					
1981	28	17 60,7	23 82,1	23 83,1	24 85,7	24 85,7	25 89,3	28 100
1982	58	37 63,8	55 94,9	55 94,9	56 96,6	56 96,6	56 96,6	58 100
1983	56	28 50,0	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5
1984	70	40 57,1	53 75,8	55 78,6	58 82,9	60 85,7	66 94,3	69 98,6
1985	63	36 57,1	53 84,1	54 85,7	54 85,7	55 87,3	61 96,8	62 98,4
1986	30	18 60,0	24 80,0	24 80,0	25 83,3	26 86,6	27 90,0	27 90,0
TOTAL	345	204 59,1	297 86,0	300 86,9	306 88,7	310 89,9	324 94,0	333 96,6

TABLA 47.- *Citrobacter* spp: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1981	15	5 33,2	12 79,9	12 79,9	13 86,6	13 86,6	14 93,3	14 93,3
1982	58	23 39,7	54 93,2	55 94,9	56 96,6	56 96,6	56 96,6	57 98,3
1983	56	18 32,1	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5
1984	70	19 27,1	52 74,2	54 77,1	55 78,5	56 79,9	59 84,2	64 91,4
1985	63	18 28,6	53 84,2	54 85,8	55 87,4	55 87,4	56 89,0	60 95,4
1986	30	9 30,0	23 76,7	24 80,0	24 80,0	25 83,3	25 83,3	25 83,3
<u>TOTAL</u>	292	92 31,5	243 83,2	248 84,9	252 86,3	254 87,0	259 88,7	269 92,1

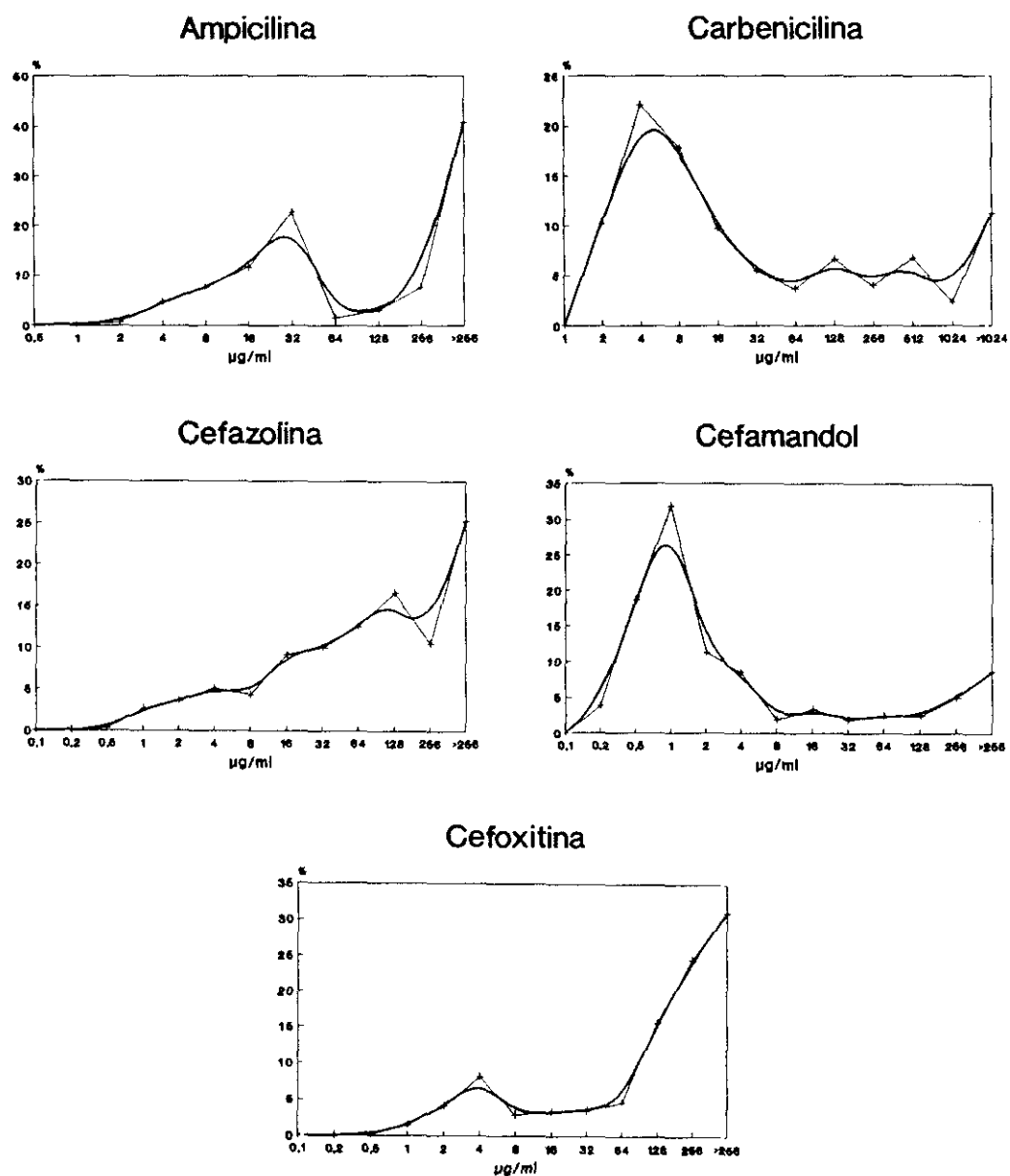
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1983	56	39 69,3	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5	49 87,5
1984	70	46 65,7	54 77,1	55 78,5	58 82,8	60 85,7	66 94,3	70 100
1985	63	44 69,8	53 84,1	54 85,7	55 87,3	57 90,5	60 95,2	62 98,4
1986	30	22 73,3	24 80,0	24 80,0	26 86,7	26 86,7	26 86,7	27 90,0
<u>TOTAL</u>	219	151 68,9	180 82,2	182 83,1	188 85,9	192 87,7	201 91,8	208 95,0

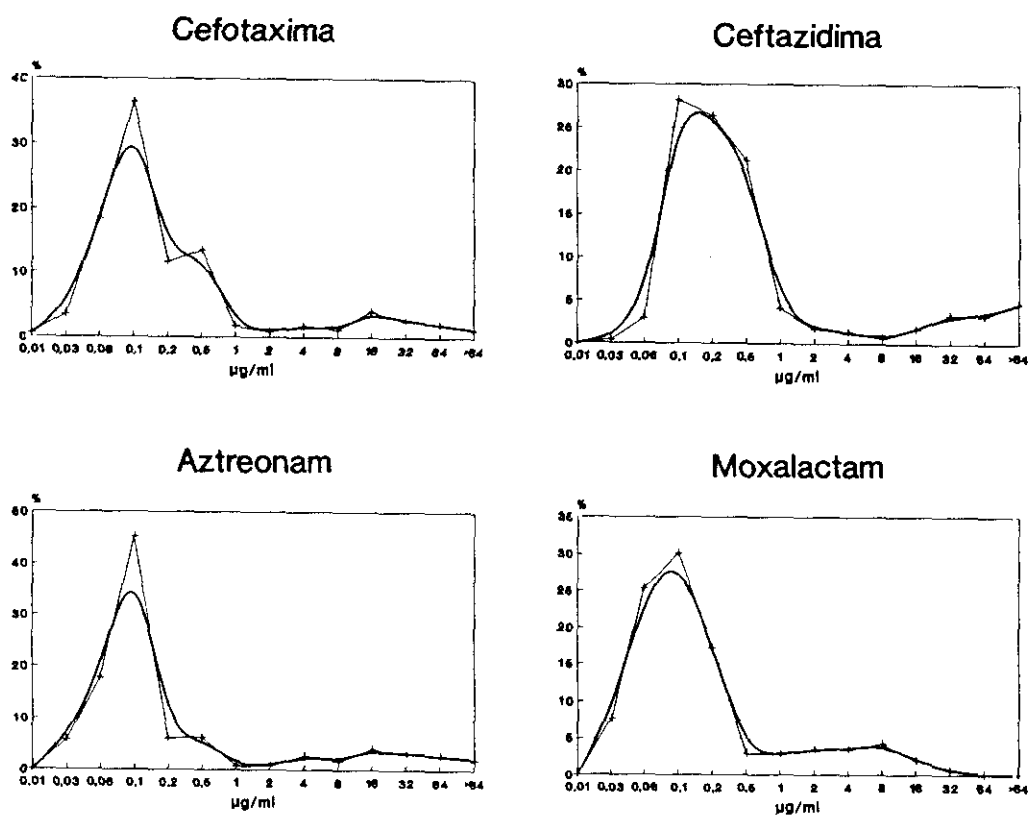
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1980	40	27 67,5	40 100					
1981	28	16 57,2	23 82,2	23 82,2	25 89,3	27 96,4	28 100	
1982	58	42 72,4	55 94,9	56 96,6	57 98,3	57 98,3	57 98,3	58 100
1983	56	30 53,6	48 85,7	49 87,5	49 87,5	56 100		
1984	70	45 64,3	54 77,1	59 84,3	63 90,0	68 97,2	70 100	
1985	63	42 66,7	54 85,7	58 92,1	60 95,2	60 95,2	63 100	
1986	30	16 53,4	23 76,8	24 80,1	27 90,1	28 93,4	29 96,7	30 100
<u>TOTAL</u>	345	218 63,2	297 86,1	309 89,6	321 93,1	336 97,4	343 99,4	345 100

10.2 *Citrobacter freundii*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 20.



10.2 *Citrobacter freundii*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 21.



10.3 Citrobacter freundii: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 48A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	30 Grado	32-	256 8,5	8	25,30	54,38	64
Carbenicilina	30 Grado	4	6,8	8	32,97	54,76	64
Cefazolina	Exponenc	256	365,3	>256	-	329,36	>256
Cefamandol	30 Grado	1	1,0	1	8,97	12,07	16
Cefoxitina	30 Grado	4-	256 1,6	2	3,21	5,36	4
Cefotaxima	30 Grado	0,1	0,15	0,2	1,83	1,83	2
Ceftazidima	30 Grado	0,1	0,20	0,2	2,10	2,57	2
Aztreonam	30 Grado	0,1	0,13	0,1	1,60	1,72	2
Moxalactam	30 Grado	0,1	0,11	0,1	0,99	1,15	1

10.4 Citrobacter freundii: Fenotipos de resistencia microbiosa y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 48B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	-	S	S	S	S	S	S	13,7%	13,2%
2	S	S	-	S	R	S	S	S	S	35,1%	-
3	R	R	-	S	S	S	S	S	S	<1%	7,1%
4	R	R	-	S	R	S	S	S	S	20,2%	16,3%
5	R	R	-	R	R	S	S	S	S	4,6%	3,5%
6	R	R	-	R	R	R	R	R	R	5,9%	3,5%
7	R	S	-	S	R	S	S	S	S	10,3%	42,4%
8	R	S	-	R	R	S	S	S	S	1,2%	8,2%
9	R	S	-	R	R	R	R	R	R	8,8%	5,8%

10.5 Citrobacter freundii: Evolución de la sensibilidad antibióticos betalactámicos. TABLA 48C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Carbenicilina	64 ug/ml	+ 0,40234
	>256 ug/ml	- 0,69027
Cefamandol	<1 ug/ml	+ 0,42018
	16 ug/ml	- 0,24537
Cefotaxima	<0,1 ug/ml	- 0,54526
	2 ug/ml	- - - -

11.- *Morganella morganii*

11.1 *Morganella morganii*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas. TABLA 49.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	23			1 4,3	1 4,3	2 8,6	23 100
1978	58			1 1,7	2 3,4	3 5,1	58 100
1979	73				2 2,7	4 5,4	73 100
1980	66			1 1,5	2 3,0	3 4,5	67 100
1981	67	1 1,5	1 1,5	2 3,0	4 6,0	6 9,0	67 100
1982	77				1 1,3	7 9,1	77 100
1983	89			1 1,1	2 2,2	6 6,7	89 100
1984	91						91 100
1985	84			2 2,4	4 4,8	12 14,3	84 100
1986	65			1 1,5	1 1,5	3 4,5	65 100
TOTAL	693	1 0,1	1 0,1	9 1,2	19 2,7	46 6,6	693 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	23	19 82,6	20 87,0	20 87,0	23 100
1978	58	45 77,6	48 82,7	50 86,2	58 100
1979	73	60 82,2	61 83,6	63 86,3	73 100
1980	66	56 84,8	59 89,3	60 90,8	66 100
1981	67	56 83,6	57 85,1	58 86,6	67 100
1982	77	65 84,4	66 85,7	69 89,6	77 100
1983	89	73 82,0	76 85,4	78 87,6	89 100
1984	91	69 75,8	71 78,0	72 79,1	91 100
1985	84	81 96,4	81 96,4	81 96,4	84 100
1986	65	58 89,2	60 92,3	60 92,3	65 100
TOTAL	693	582 84,0	599 86,5	611 88,2	693 100

TABLA 50.- *M. morganii*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	23	1 4,3	1 4,3	1 4,3	2 8,6	23 100
1978	58		1 1,7	3 5,2	4 6,9	58 100
1979	73		1 1,4	2 2,8	2 2,8	73 100
1980	66	1 1,5	3 4,5	5 7,5	5 7,5	66 100
1981	67	2 3,0	3 4,5	5 7,5	6 9,0	67 100
1982	77	1 1,3	2 2,6	2 2,6	6 7,8	77 100
1983	89	1 1,1	1 1,1	3 3,3	4 4,4	89 100
1984	91	1 1,1	2 2,2	3 3,3	3 3,3	91 100
1985	84			2 2,4	3 3,6	84 100
1986	65	1 1,5	1 1,5	2 3,0	3 4,5	65 100
TOTAL	693	8 1,1	15 2,1	28 4,0	38 5,5	693 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	≤1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	>32 ug/ml
1977	23	5 21,7	9 39,1	12 52,1	14 60,8	18 78,3	20 87,0	23 100
1978	58	9 15,5	18 31,0	24 41,3	36 62,0	43 74,1	50 86,2	58 100
1979	73	10 13,7	24 32,9	33 45,2	47 64,4	54 74,0	62 85,0	73 100
1980	66	13 19,7	26 39,4	37 56,1	50 75,8	55 83,4	60 91,0	66 100
1981	67	15 22,4	31 46,3	41 61,2	49 73,1	59 88,0	62 92,5	67 100
1982	77	14 18,2	26 33,8	34 44,2	47 61,0	58 75,3	66 85,7	77 100
1983	89	18 20,2	32 35,9	47 52,7	63 70,7	73 82,0	79 88,7	89 100
1984	91	7 7,7	17 18,7	28 30,8	47 51,7	58 63,8	70 77,0	91 100
1985	84	23 27,4	40 47,6	55 65,4	64 76,1	75 89,2	80 95,2	84 100
1986	65	16 24,6	31 47,7	38 58,5	48 74,0	54 83,2	59 90,9	65 100
TOTAL	693	130 18,8	254 36,7	349 50,4	465 67,2	547 79,0	608 87,8	693 100

TABLA 51.- M. morganii: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTITINA.**

AÑO	Nº	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	23			2 8,7	9 39,1	21 91,4	22 95,7	23 100
1978	58		1 1,7	9 15,5	26 44,8	55 94,8	58 100	
1979	73		1 1,4	6 8,2	25 34,2	68 93,1	72 98,6	73 100
1980	66	1 1,5	3 4,5	8 12,1	29 43,9	59 89,4	64 97,0	66 100
1981	67	1 1,5	2 3,0	8 11,9	27 40,2	65 96,9	67 100	
1982	77		2 2,6	5 6,5	29 37,7	69 89,6	76 98,7	77 100
1983	89		2 2,2	10 11,2	34 38,2	77 86,5	86 96,6	89 100
1984	91		1 1,1	5 5,5	24 26,4	80 87,9	89 97,8	91 100
1985	84		1 1,2	5 6,0	44 52,4	80 95,2	82 97,6	84 100
1986	65		2 3,1	5 7,7	17 26,2	60 92,3	63 96,9	65 100
TOTAL	693	2 0,3	15 2,2	63 9,1	264 38,1	634 91,5	679 98,0	693 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	66	53 80,3	62 94,0	62 94,0	62 94,0	63 95,0	65 98,5	65 98,5
1981	67	59 88,0	64 95,5	65 97,0	65 97,0	66 98,5	66 98,5	66 98,5
1982	77	68 88,3	74 96,1	75 97,4	76 98,7	77 100		
1983	89	77 86,5	81 91,0	83 93,2	86 96,7	88 98,9	89 100	
1984	91	70 76,9	77 84,6	80 87,9	81 89,0	90 98,9	91 100	
1985	84	80 95,2	82 97,6	82 97,6	83 97,8	84 100		
1986	65	54 83,1	61 93,9	61 93,9	62 95,4	64 98,5	64 98,5	64 98,5
TOTAL	539	461 85,5	501 93,0	508 94,3	515 95,6	532 98,7	536 99,4	536 99,4

TABLA 52.- *M. morganii*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1981	40	31 77,5	38 95,0	38 95,0	39 97,5	39 97,5	39 97,5	39 97,5
1982	77	67 87,0	74 96,1	76 98,7	76 98,7	77 100		
1983	89	69 77,5	79 88,7	82 92,2	86 96,7	88 98,9	89 100	
1984	91	65 71,4	75 82,4	77 84,6	78 85,7	81 89,0	90 98,9	91 100
1985	84	72 85,7	82 97,6	82 97,6	82 97,6	83 98,8	84 100	
1986	65	53 81,6	61 94,0	62 95,5	62 95,5	63 97,0	63 97,0	64 98,5
TOTAL	446	357 80,0	409 91,7	417 93,5	423 94,7	431 96,5	442 99,0	444 99,5

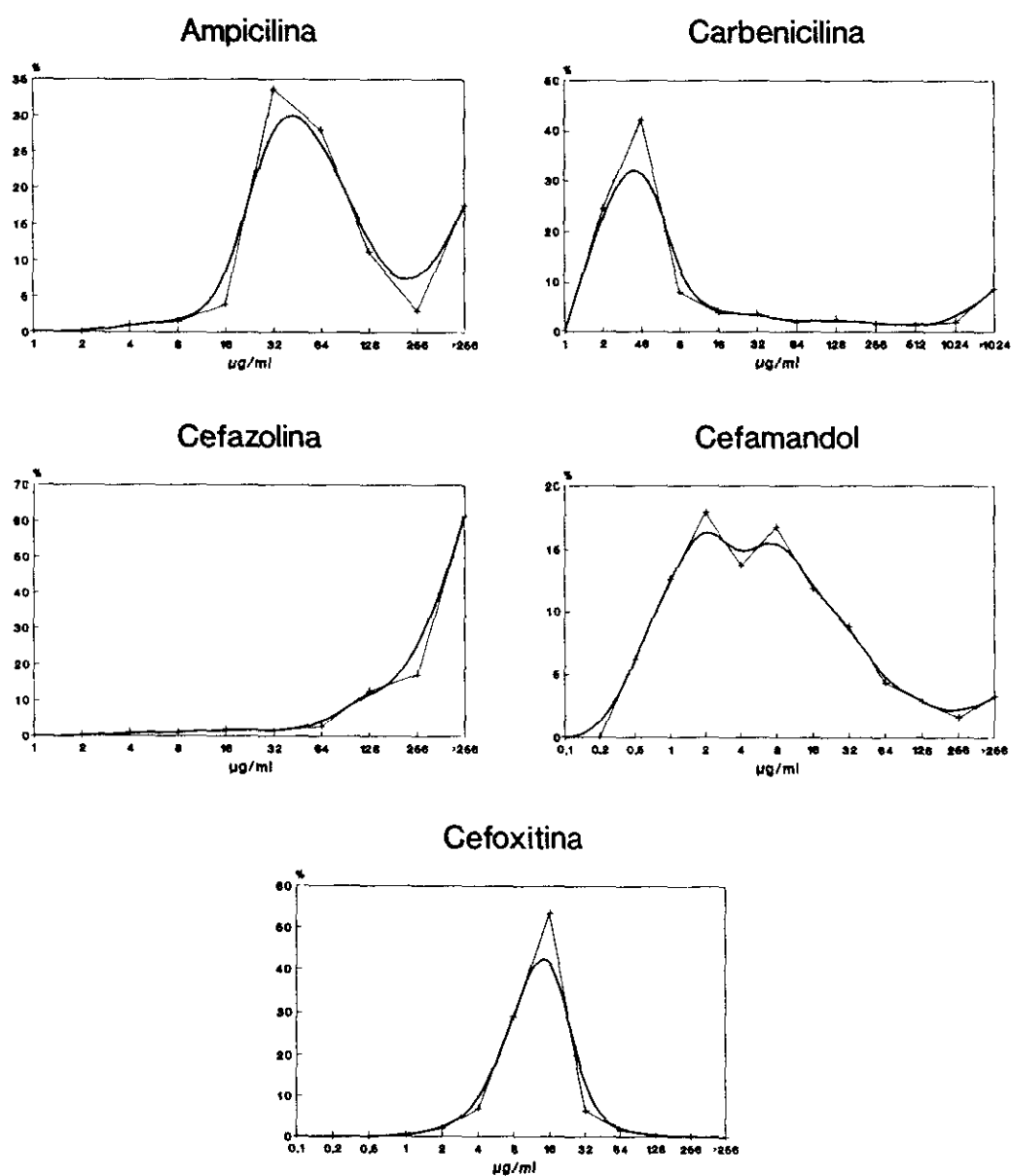
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	≥ 32 ug/ml
1983	89	80 89,9	83 93,3	84 94,4	89 100			
1984	91	75 82,4	82 90,1	84 92,3	91 100			
1985	84	79 94,0	82 97,6	83 98,8	84 100			
1986	65	56 86,0	62 95,2	63 96,8	63 96,8	64 98,4	64 98,4	64 98,4
TOTAL	329	290 88,2	309 94,0	314 95,5	327 99,4	328 99,7	328 99,7	328 99,7

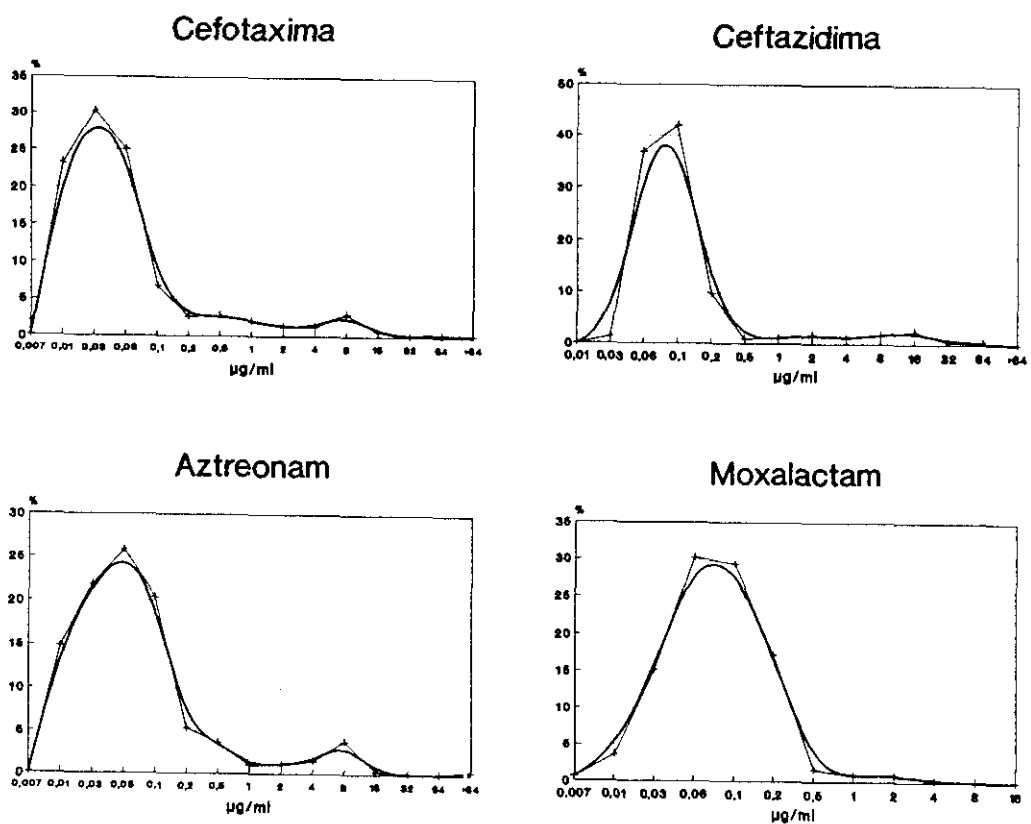
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0.1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml
1980	66	46 69,7	66 100		
1981	67	50 74,6	65 97,0	66 98,5	67 100
1982	77	67 87,0	75 97,4	77 100	
1983	89	75 84,3	88 98,9	89 100	
1984	91	74 81,3	91 100		
1985	84	66 78,6	84 100		
1986	65	48 73,8	64 98,4	65 100	
TOTAL	539	426 79,0	533 98,8	538 99,8	539 100

11.2 *Morganella morganii*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 22.



11.2 *Morganella morganii*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 23.



11.3 *Morganella morganii*: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 53A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	30 Grado	32	28,81	32	119,82	336,6	>256
Carbenicilina	30 Grado	4	4,63	4	24,47	20,32	16
Cefazolina	Exponenc	256	1077	>256	-	1013	>256
Cefamandol	30 Grado	2	2,96	2	28,10	84,01	64
Cefoxitina	30 Grado	16	9,06	8	40,96	39,81	32
Cefotaxima	30 Grado	0,03	0,05	0,06	0,26	0,24	0,2
Ceftazidima	30 Grado	0,1	0,12	0,1	1,20	0,82	1
Aztreonam	30 Grado	0,01	0,03	0,03	0,15	0,19	0,2
Moxalactam	30 Grado	0,06	0,08	0,1	0,37	0,39	0,5

11.4 *Morganella morganii*: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 53B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	S	S	-	S	S	S	S	S	S	6,5%	2,7%
2	R	R	-	S	S	S	S	S	S	13,4%	7,8%
3	R	R	-	R	S	S	S	S	S	3,7%	8,2%
4	R	R	-	R	S	R	R	R	S	2,4%	<1%
5	R	R	-	R	R	R	R	R	R	2,0%	-
6	R	S	-	S	S	S	S	S	S	58,8%	67,5%
7	R	S	-	R	S	S	S	S	S	3,1%	4,1%
8	R	S	-	R	S	S	S	S	S	4,8%	9,2%
9	R	S	-	R	S	R	R	R	S	5,3%	<1%

11.5 *Morganella morganii*: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 53C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Carbenicilina	< 64 ug/ml	+ 0,48201
	>256 ug/ml	- 0,45444
Cefamandol	2 ug/ml	+ 0,20404
	32 ug/ml	- 0,16829
Cefoxitina	8 ug/ml	- 0,27304
	32 ug/ml	- 0,16046
Cefotaxima	< 0,1 ug/ml	+ 0,14661
	< 1 ug/ml	- 0,13513

12.- *Serratia marcescens*

12.1 *Serratia marcescens*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.
TABLA 54.

ANTIBIOTICO: AMPICILINA.

AÑO	Nº	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>16 ug/ml
1977	43		2 4,7	4 9,4	43 100
1978	146	2 1,4	5 3,4	11 7,5	146 100
1979	188	1 0,5	5 2,6	14 7,4	188 100
1980	200		3 1,5	11 5,5	200 100
1981	157	2 1,3	7 4,5	13 8,3	157 100
1982	124	2 1,7	8 6,5	14 11,3	124 100
1983	312	1 0,3	10 3,2	30 9,6	312 100
1984	314	1 0,4	4 1,3	10 3,2	314 100
1985	485	4 0,8	9 1,8	26 5,3	485 100
1986	321	3 0,9	9 2,8	24 7,5	321 100
<u>TOTAL</u>	2290	16 0,7	62 2,7	157 6,9	2290 100

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	43	20 46,5	21 48,8	23 53,5	43 100
1978	146	61 41,8	64 43,8	69 47,3	146 100
1979	188	62 33,0	66 35,1	70 37,2	188 100
1980	200	58 29,0	64 32,0	68 34,0	200 100
1981	157	84 53,5	86 54,8	89 56,7	157 100
1982	124	57 46,0	58 46,8	60 48,4	124 100
1983	312	162 51,9	172 55,1	182 58,3	312 100
1984	314	126 40,1	128 40,7	132 42,0	314 100
1985	485	165 34,0	174 35,9	180 37,1	485 100
1986	321	164 51,1	170 53,0	179 55,8	321 100
<u>TOTAL</u>	2290	959 41,9	1003 43,8	1052 45,9	2290 100

TABLA 55.- S. marcescens: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFAZOLINA.**

AÑO	Nº	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	43				1 2,3	43 100
1978	146			1 0,7	3 2,1	146 100
1979	188		1 0,5	1 0,5	3 1,5	188 100
1980	200				1 0,5	200 100
1981	157			1 0,6	2 1,2	157 100
1982	124				2 1,6	124 100
1983	312				1 0,3	312 100
1984	314		1 0,3	2 0,6	3 0,9	314 100
1985	485	1 0,2	2 0,4	4 0,8	5 1,0	485 100
1986	321			3 0,9	4 1,2	321 100
TOTAL	2290	1 0,1	4 0,2	12 0,5	25 1,1	2290 100

ANTIBIOTICO: CEFAMANDOL.

AÑO	Nº	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	43		1 2,3	2 4,6	5 11,6	8 18,6	11 25,6	43 100
1978	146	1 0,7	2 1,4	4 2,8	15 10,3	24 16,5	29 19,9	146 100
1979	188		1 0,5	1 0,5	14 7,4	24 12,7	28 14,9	188 100
1980	200	1 0,5	2 1,0	4 2,0	14 7,0	20 10,0	22 11,0	200 100
1981	157		1 0,6	6 3,8	18 11,4	37 23,5	47 29,9	157 100
1982	124	1 0,8	2 1,6	4 3,2	14 11,3	24 19,4	30 24,2	124 100
1983	312	1 0,3	2 0,6	8 2,5	19 6,0	49 15,6	88 28,2	312 100
1984	314	2 0,6	4 1,2	6 1,8	15 4,7	28 8,9	51 16,2	314 100
1985	485	2 0,4	4 0,8	15 3,1	27 5,6	37 7,7	59 12,2	485 100
1986	321	1 0,3	2 0,6	9 2,8	24 7,5	48 15,0	87 27,1	321 100
TOTAL	2290	9 0,4	21 0,9	59 2,6	165 7,2	299 13,0	452 19,7	2290 100

TABLA 56.- *S. marcescens*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.**

AÑO	Nº	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml	> 32 ug/ml
1977	43	1 2,3	7 16,2	22 51,1	32 74,4	43 100
1978	146	5 3,4	28 19,1	69 47,3	107 73,3	146 100
1979	188	8 4,3	26 13,9	71 37,8	134 71,3	188 100
1980	200	2 1,0	11 5,5	47 23,5	133 66,5	200 100
1981	157	6 3,8	26 16,5	71 45,2	127 80,9	157 100
1982	124	4 3,2	23 18,5	68 54,8	98 79,0	124 100
1983	312	4 1,3	55 17,6	177 56,7	248 79,5	312 100
1984	314		19 6,0	139 44,2	208 66,2	314 100
1985	485	20 4,1	112 23,1	285 58,8	339 69,9	485 100
1986	321	5 1,6	24 7,5	152 47,4	211 65,8	321 100
TOTAL	2290	55 2,4	331 14,5	1101 48,1	1637 71,5	2290 100

ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	200	12 6,0	156 78,0	165 82,5	186 93,0	193 96,5	196 98,0	198 99,0
1981	157	17 10,8	134 85,4	139 88,6	142 90,5	152 96,9	155 98,9	157 100
1982	124	7 5,6	99 79,8	105 84,6	120 96,8	122 98,4	123 99,2	123 99,2
1983	312	31 9,9	229 73,4	248 79,5	269 86,2	282 90,4	291 93,3	305 97,8
1984	314	21 6,7	197 62,7	235 74,8	282 89,8	303 96,5	308 98,1	309 98,4
1985	485	75 15,5	316 65,2	401 82,7	447 92,2	462 95,3	474 97,8	484 99,8
1986	321	28 8,7	193 60,1	228 71,0	270 84,1	295 91,9	308 95,9	317 98,7
TOTAL	1913	191 10,0	1324 69,2	1521 79,5	1716 89,7	1809 94,6	1855 97,0	1893 99,0

TABLA 57.- S. marcescens: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.**

AÑO	Nº	≤ 0, 1ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>32 ug/ml
1981	114	22 19,3	108 94,7	112 98,2	114 100			
1982	124	31 25,0	118 95,2	120 96,8	122 98,4	123 99,2	123 99,2	123 99,2
1983	312	93 29,8	292 93,6	300 96,2	304 97,5	309 99,1	310 99,4	311 99,7
1984	314	52 16,6	292 93,0	306 97,5	312 99,4	314 100		
1985	485	87 17,9	459 94,6	480 99,0	483 99,6	485 100		
1986	321	79 24,6	282 87,8	310 96,5	318 99,1	321 100		
TOTAL	1670	364 21,8	1551 92,9	1628 97,5	1653 99,9	1666 99,8	1667 99,8	1668 99,9

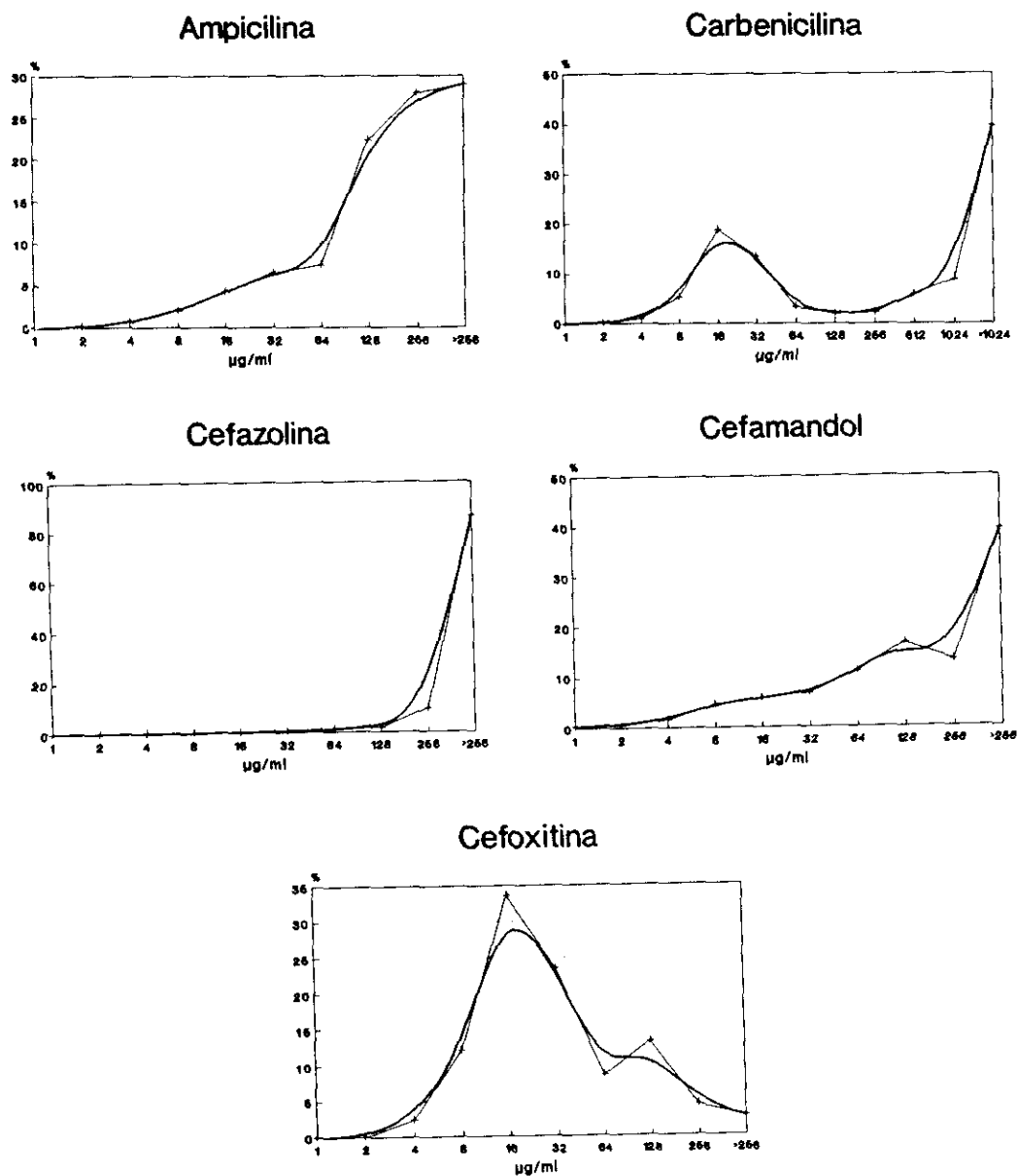
ANTIBIOTICO: AZTREONAM.

AÑO	Nº	≤ 0, 1ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>32 ug/ml
1983	312	107 34,3	256 82,1	273 87,6	295 94,6	303 97,2	307 98,4	310 99,4
1984	314	111 35,3	290 92,3	305 97,1	308 98,1	312 99,4	313 99,7	314 100
1985	485	166 34,2	447 92,1	467 96,2	479 98,7	484 99,8	484 99,8	484 99,8
1986	321	96 29,9	276 86,0	283 88,2	305 95,0	310 96,6	316 98,5	320 99,7
TOTAL	1432	480 33,5	1269 88,6	1328 92,7	1387 96,8	1409 98,3	1420 99,1	1428 99,7

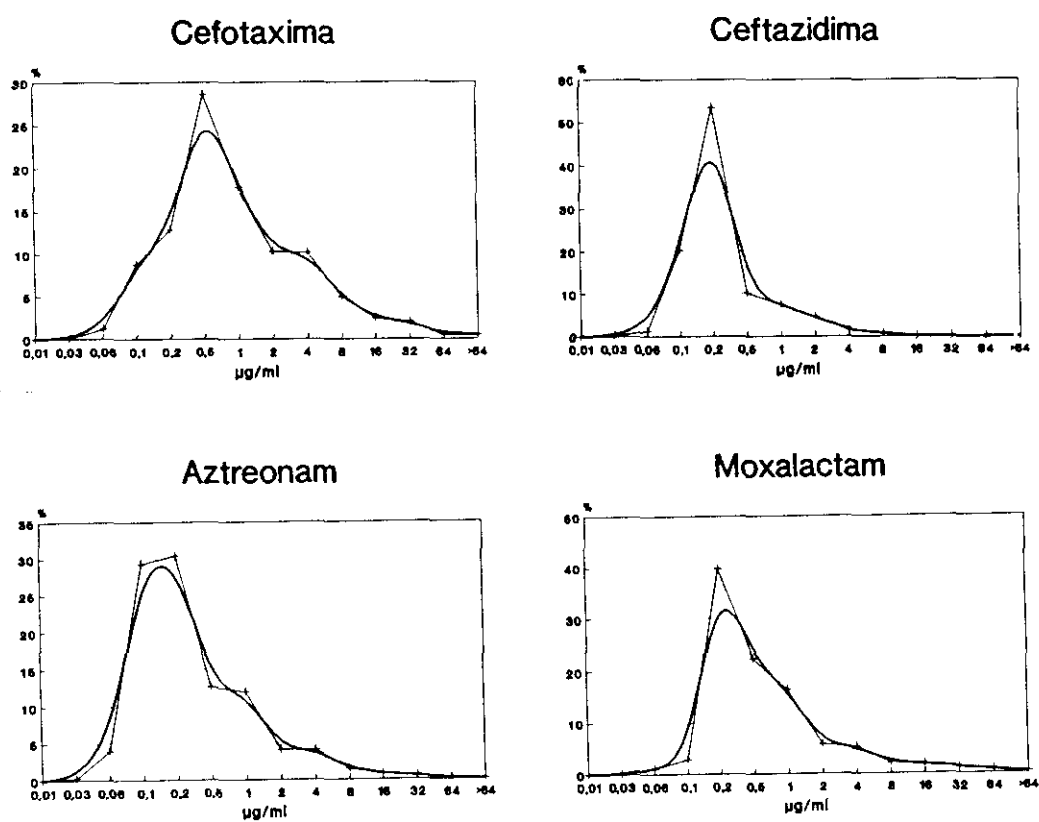
ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0, 1ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	>32 ug/ml
1980	200	4 2,0	168 84,0	178 89,0	187 93,5	192 96,0	193 96,5	196 98,0
1981	157	5 3,2	138 87,9	146 93,1	151 96,3	155 98,8	156 99,4	156 99,4
1982	124	4 3,2	104 83,8	111 89,4	119 96,0	120 96,8	123 99,2	123 99,2
1983	312	22 7,1	265 84,9	281 90,0	296 94,8	302 96,7	308 98,6	310 99,3
1984	314	6 1,9	246 78,3	274 87,2	293 93,3	296 94,2	297 94,5	305 97,1
1985	485	25 5,1	397 81,8	424 87,4	451 93,0	459 94,6	475 97,9	484 99,7
1986	321	10 3,1	260 81,0	273 85,1	292 91,0	307 95,7	315 98,2	319 99,4
TOTAL	1913	76 4,0	1578 82,5	1687 88,2	1789 93,5	1831 95,7	1867 97,6	1893 98,9

12.2 *Serratia marcescens*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 24.



12.2 *Serratia marcescens*: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 25.



12.3 *Serratia marcescens*: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 58A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Ampicilina	Exponenc	256	299,2	>256	-	279,9	>256
Carbenicilina	3º Grado	16	16,29	16	64,19	89,85	64
Cefazolina	Exponenc	256	1228	>256	-	1181	>256
Cefamandol	Exponenc	256	520	>256	-	483,7	>256
Cefoxitina	3º Grado	16	18,82	16	156,11	206,7	256
Cefotaxima	3º Grado	0,5	0,48	0,5	5,73	10,29	8
Ceftazidima	3º Grado	0,2	0,19	0,2	1,98	1,95	2
Aztreonam	3º Grado	0,2	0,22	0,2	2,69	2,72	2
Moxalactam	3º Grado	0,2	0,36	0,5	3,71	4,16	4

12.4 *Serratia marcescens*: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 58B.

Antibióticos betalactámicos								Fenotipos (%)	
NO	AMP*CAR	CFZ	CFM*FOX	TAX	CAZ	AZT	MOX	Microbiol.	Clínica
1	- S	- - S	S S S S	41,5%	41,5%				
2	- S	- - R	S S S S	<1%	<1%				
3	- S	- - R	R - R - R - R	<1%	<1%				
4	- R	- - S	S - S - S - S	51,3%	6,2%				
5	- R	- - R	S S S S	<1%	48,8%				
6	- R	- - R	R S R R	4,0%	2,9%				
7	- R	- - R	R R R R	2,4%	<1%				

* No estimados para fenotipos de resistencia microbiológica.

12.5 *Serratia marcescens*: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 58C.

Antimicrobiano	Concentración	Coefficiente de correlación (r)
Carbenicilina	64 ug/ml	+ 0,17862
	>256 ug/ml	- 0,12568
Cefoxitina	16 ug/ml	+ 0,33504
	32 ug/ml	- 0,28741
Cefotaxima	<1 ug/ml	- 0,89393
	8 ug/ml	- 0,50304
Ceftazidima	<0,1 ug/ml	- 0,05378
	2 ug/ml	- 0,02974

13.- *Pseudomonas aeruginosa*

13.1 *Pseudomonas aeruginosa*: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas. TABLA 59.

ANTIBIOTICO: CARBENICILINA.

AÑO	Nº	≤ 64 ug/ml	128 ug/ml	256 ug/ml	> 256 ug/ml
1977	82	64 78,0	70 85,3	80 87,5	82 100
1978	372	285 76,6	345 92,7	358 96,2	372 100
1979	342	278 81,3	318 93,0	322 94,2	342 100
1980	370	300 81,1	338 91,4	354 95,7	370 100
1981	339	292 86,1	324 95,5	333 98,2	339 100
1982	461	371 80,5	422 91,5	438 95,0	461 100
1983	576	478 83,0	534 92,7	553 96,0	576 100
1984	772	598 77,5	684 88,6	728 94,3	772 100
1985	752	630 83,8	696 92,6	719 95,6	752 100
1986	513	465 90,7	485 94,6	494 96,3	513 100
TOTAL	4579	3761 82,1	4216 92,2	4379 95,6	4579 100

ANTIBIOTICO: CEFTAZIDIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	32 ug/ml
1981	229		80 34,9	172 75,1	206 90,0	226 98,7	226 98,7	228 99,6
1982	461	1 0,2	171 37,1	377 81,8	402 87,2	418 90,7	426 92,4	440 95,4
1983	576	1 0,2	184 32,0	458 79,6	535 93,0	561 97,5	568 98,6	573 99,5
1984	772	5 0,6	260 33,7	580 75,2	709 91,9	751 97,3	761 98,6	771 99,9
1985	752	3 0,4	268 35,6	588 78,2	699 93,0	720 95,8	729 97,0	744 99,0
1986	513	2 0,4	162 31,6	387 75,5	440 85,8	475 92,6	485 94,5	503 98,1
TOTAL	3303	12 0,4	1125 34,1	2562 77,7	2991 90,7	3151 95,5	3195 96,8	3259 98,7

TABLA 60.- P. aeruginosa: % acumulativo de sensibilidad a concentraciones críticas.**ANTIBIOTICO: AZTREONAM.**

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1983	576	5 0,9	26 4,5	81 14,0	306 53,1	496 86,1	541 93,9	556 96,5
1984	772	7 0,9	47 6,1	155 20,1	472 61,1	647 83,8	727 94,2	757 98,1
1985	752	4 0,5	37 4,9	112 14,9	397 52,8	615 81,8	683 90,8	734 97,6
1986	513	4 0,8	18 3,5	44 8,6	244 47,6	397 77,4	464 90,5	493 96,1
TOTAL	2613	20 0,7	128 4,8	392 14,9	1419 54,2	2155 82,5	2415 92,4	2540 97,2

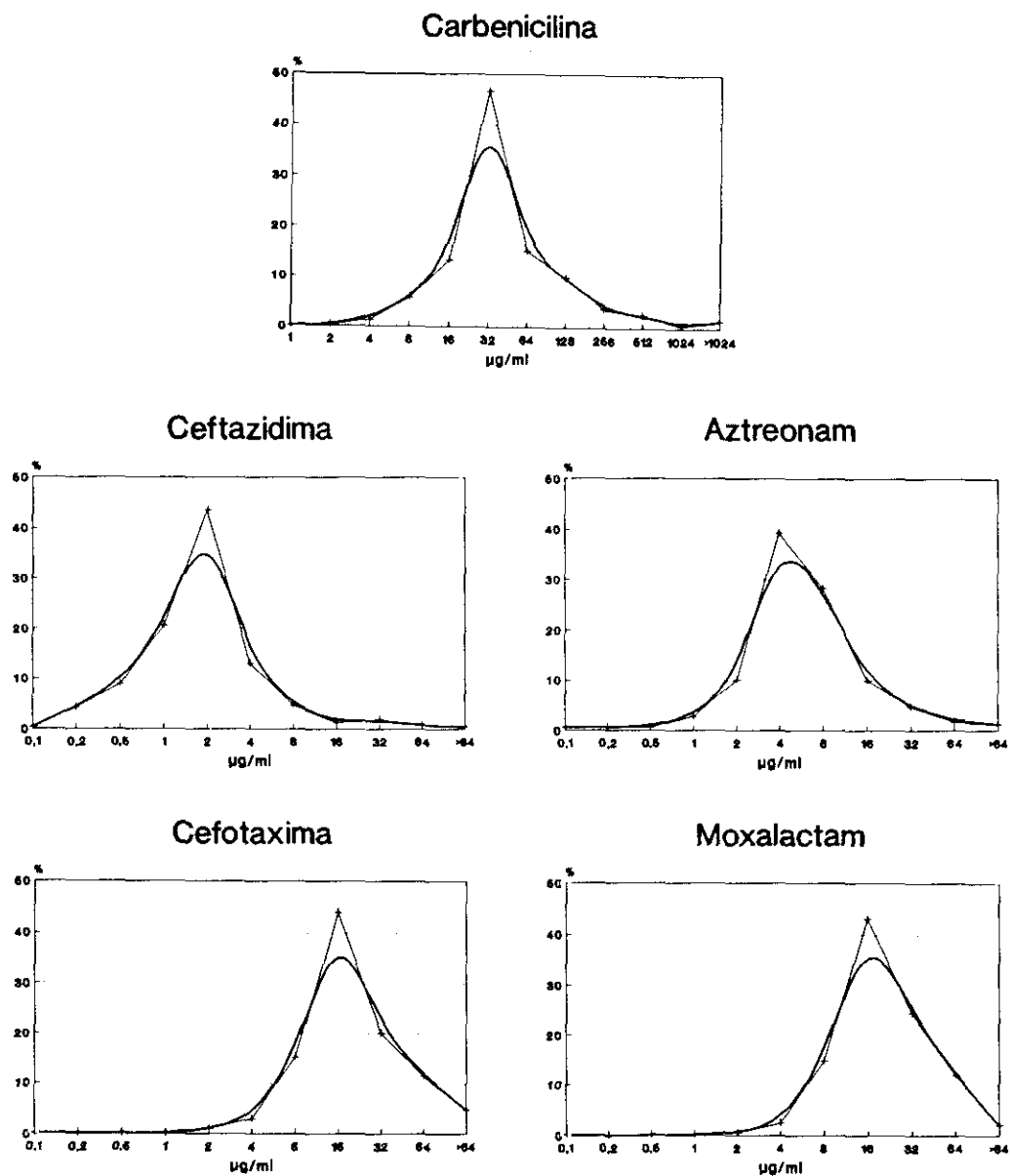
ANTIBIOTICO: CEFOTAXIMA.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	370		1 0,3	7 2,0	22 6,0	81 21,9	233 73,0	303 81,9
1981	339		2 0,6	6 1,8	19 5,6	69 20,4	239 64,7	269 79,4
1982	461	1 0,2	2 0,4	5 1,0	15 3,2	80 17,3	264 57,2	364 79,0
1983	576	1 0,2	2 0,4	7 1,3	30 5,3	104 18,1	387 67,2	484 84,0
1984	772	2 0,2	7 0,9	8 1,0	24 3,1	154 19,9	517 66,9	648 83,9
1985	752	2 0,3	4 0,6	16 2,2	44 5,9	174 23,1	514 68,3	674 89,6
1986	513	1 0,2	2 0,4	9 1,8	18 3,5	84 16,4	274 53,4	426 83,1
TOTAL	3783	7 0,2	20 0,5	58 1,5	172 4,5	746 19,7	2408 63,6	3168 83,7

ANTIBIOTICO: MOXALACTAM.

AÑO	Nº	≤ 0,1 ug/ml	≤ 1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	> 32 ug/ml
1980	370		1 0,3	3 0,8	13 3,5	78 21,1	222 60,0	314 84,9
1981	339		1 0,3	2 0,6	10 3,0	53 15,7	199 58,7	276 81,4
1982	461		1 0,2	4 0,8	11 2,3	66 14,2	241 52,2	363 78,7
1983	576	1 0,2	5 0,9	10 1,8	40 7,1	133 23,2	377 65,5	490 85,1
1984	772	1 0,1	5 0,6	10 1,2	36 4,6	182 23,5	517 66,9	682 88,3
1986	513		1 0,2	2 0,4	2 0,4	71 13,9	248 48,3	133 25,9
1986	513		1 0,2	3 0,6	5 1,0	76 14,9	324 63,2	457 89,1
TOTAL	3783	3 0,1	19 0,5	40 1,1	136 3,6	697 18,4	2329 61,5	3251 85,9

13.2 Pseudomonas aeruginosa: Distribución de aislamientos para cada concentración de antimicrobiano. FIGURA 26.



13.3 Pseudomonas aeruginosa: Puntos críticos de sensibilidad-resistencia a antibióticos betalactámicos. TABLA 61A.

Antimicrobiano	Ecuación	Moda	A.máx	PCSM	A.inflx	A.95%	PCRM
Carbenicilina	30 Grado	32	26,44	32	160,86	219,2	256
Cefotaxima	20 Grado	16	18,25	16	-	52,35	64
Ceftazidima	20 Grado	2	2,55	2	-	15,14	16
Aztreonam	20 Grado	4	5,72	4	-	27,86	32
Moxalactam	20 Grado	16	21,14	16	-	73,00	64

13.4 Pseudomonas aeruginosa: Fenotipos de resistencia microbiológica y clínica a antibióticos betalactámicos. TABLA 61B.

Antibióticos betalactámicos										Fenotipos (%)	
Nº	AMP	CAR	CFZ	CFM	FOX	TAX	MOX	CAZ	AZT	Microbiol.	Clínica
1	-	S	-	-	-	S	S	S	S	92,3%	46,8%
2	-	S	-	-	-	R	R	S	S	1,1%	29,1%
3	-	S	-	-	-	R	R	S	R	<1%	4,4%
4	-	S	-	-	-	R	R	R	R	2,0%	1,8%
5	-	R	-	-	-	S	S	S	S	2,8%	15,6%
6	-	R	-	-	-	R	R	S	S	<1%	<1%
7	-	R	-	-	-	R	R	R	R	1,3%	1,8%

13.5 Pseudomonas aeruginosa: Evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos. TABLA 61C.

Antimicrobiano	Concentración	Coeficiente de correlación (r)
Carbenicilina	≤64 ug/ml	+ 0,62387
	>256 ug/ml	+ 0,47324
Ceftazidima	2 ug/ml	- 0,02545
	16 ug/ml	- 0,14627

IV.- DISCUSSION

IV.- DISCUSION

1.- ESCHERICHIA COLI Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

E. coli es un microorganismo caracterizado por su gran ubicuidad, por tanto acostumbrado a "convivir" en múltiples habitats, y sin duda muy familiarizado con el ambiente creado en torno a los antimicrobianos. En relación con el hombre, **E. coli**, es la bacteria gram-negativa más frecuente como integrante de la flora habitual, y la más prevalente en las infecciones nosocomiales y en algunas de las infecciones provenientes del medio extrahospitalario. **E. coli** es agente causal de casi el 25% de las bacteriemias, 5-10 de las neumonías nosocomiales, 65-68% de las infecciones urinarias nosocomiales y 70-78% de las de la comunidad⁵²⁵. En nuestro medio, **E. coli** es el microorganismo más frecuentemente aislado de hemocultivos, urocultivos e infecciones de tejidos blandos y heridas, y fue responsable del 45,4% de las bacteriemias por gram-negativos en los últimos tres años⁵²⁶.

E. coli, por otra parte, es un excelente modelo para el estudio de la interrelación de los microorganismos gram-negativos con los antibióticos betalactámicos (ABL). Fleming¹ en 1929, puso de manifiesto que los microorganismos del grupo "coli-tifoidea" no eran inhibidos por la penicilina, y poco después Abraham y Chain⁶⁷ demostraron que la penicilinasas contenida en extractos de **E. coli** era capaz de inactivar la penicilina, dando lugar al mecanismo de resistencia a ABL más relevante en bacilos gram-negativos. El patrón de resistencia de **E. coli** a los ABL está prioritariamente definido por la síntesis de betalactamasas (β la), y tanto la permeabilidad de la membrana externa (ME), como las alteraciones en las PBPs juegan un papel secundario. Como todos los microorganismos gram-negativos, **E. coli**, sintetiza una β la cromosómica constitutiva cuyo nivel de producción no ocasiona, habitualmente, resistencia a los ABL^{202,209}. En **E. coli**, en el que no se han caracterizado β las cromosómicas inducibles, la mayor incidencia de resistencia es debida a la codificación de β las plasmídicas clásicas, esencialmente TEM-1, y en mucha menor proporción OXA-1 y SHV-1^{216,262,309,324}. En los últimos 8 años, como en otras **Enterobacteriaceae**, se han caracterizado en **E. coli** diferentes betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado (β PEA) a nuevos ABL, que han modificado algo su patrón de resistencia, aunque la prevalencia de tales cepas sea menor del 1% de los aislamientos^{207,277}.

El comportamiento de *E. coli* frente a los ABL se ha caracterizado siempre por una distribución bimodal con un margen de CMIs más amplio para penicilinas que para cefalosporinas y otros ABL⁵²⁷⁻⁵²⁹. En nuestra serie, tras el análisis de 7.893 aislados y su sensibilidad a 9 ABL, se confirma tal distribución bimodal con diferenciación de dos poblaciones que deberían corresponder a la población sensible y resistente, respectivamente. Esta afirmación es irrefutable en relación con ampicilina y carbenicilina, en las que la distribución de aislamientos permite diferenciar de manera rotunda dos poblaciones muy distintas por sus valores de CMI, sin apenas población intermedia (Figura 1). Tal separación es menos nítida respecto de cefazolina y cefamandol con una población mayoritaria, cercana al 85%, distribuida entre un margen amplio de CMIs y otra población más exigua y concentrada en torno a valores inhibitorios elevados.

Respecto de cefoxitina y cefalosporinas de 3ª generación (Figura 2), la elevada resistencia a las β-lactámicas habituales de *E. coli*, determina que el esquema bimodal sea también evidente, con una población sensible, mayoritaria, superior al 95% y concentrada entre un escaso margen de CMIs, y una 2ª población claramente diferenciada de la anterior, poco relevante en cuanto a su número, pero sí esencial en cuanto a la resistencia y a los posibles mecanismos implicados. Los valores límites de CMI para esta población, menos sensible o resistente desde el punto de vista microbiológico, oscilan entre 0,1 y 32 ug/ml, inferiores a los farmacocinéticos considerados al uso para definir los puntos críticos de resistencia.

La representación gráfica de la distribución de los aislados en el intervalo de CMIs, se ajusta matemáticamente a un polinomio de 3º grado. Ello permite el cálculo de las abscisas máxima, de inflexión y del 95%, que hacen posible la estimación aproximada de los puntos críticos de sensibilidad y resistencia microbiológica (PCSM y PCRM), extraordinariamente útiles para establecer los criterios de sensibilidad y resistencia (Tabla 5A). El PCSM, calculado para cada ABL a expensas de la abscisa máxima que se adscribe a la CMI más próxima en el sistema de diluciones en base 2, contribuiría a la distinción de la "población sensible de pleno derecho" carente de mecanismos de resistencia relevantes. En cierta medida, este punto atestigua la actividad intrínseca de cada antibiótico y facilita el análisis comparativo. En relación con los ABL estudiados, los PCSM obtenidos

son coincidentes con la moda, con la excepción de ampicilina y cefazolina cuyos valores son ligeramente inferiores a los obtenidos por el valor más frecuente de CMI (Tabla 5A). Estos puntos de "sensibilidad plena" permiten establecer en *E. coli*, una "población sensible de pleno derecho" próxima al 30% de los aislados para ampicilina y carbenicilina; superior al 50% para cefazolina y cefamandol; y entre el 70 y 80% para ceftioxitina y las cefalosporinas de la 3ª generación. Los valores de CMI estimados como PCSM para ABL son algo superiores a los límites bajos del rango de CMIs, y coinciden con los obtenidos experimentalmente en cepas de *E. coli* con un nivel bajo de expresión de la ßla cromosómica constitutiva^{319,530,531}.

El PCRM, conceptualmente, sería equiparable a la concentración inhibitoria capaz de diferenciar la población claramente resistente. Para cada ABL vendría dado por concentraciones que inhibieran cepas dotadas de mecanismos de resistencia relevantes y de alto nivel. En un sentido diferenciativo hemos considerado aquella CMI más próxima al valor que inhibe el 95% de la población, teniendo en cuenta también la pendiente de la representación gráfica expresada por el valor de la abscisa de inflexión. Para *E. coli* los valores de CMI están recogidos en la tabla 5A y se aproximan mucho, desde la perspectiva matemática, a los obtenidos por la abscisa del 95%. La posible excepción la constituye el valor de carbenicilina, para la que hemos considerado 32 ug/ml, aunque con idéntico criterio hubiera sido posible tomar un valor de 64 ug/ml teniendo en cuenta la tendencia expresada por la abscisa de inflexión, casi en el punto medio entre ambas concentraciones. Las pequeñas discrepancias entre los PCRM para las cefalosporinas de 3ª generación permitirían tomar de manera uniforme 0,5 ug/ml como discriminatorios de la población menos sensible, como hemos podido comprobar de manera experimental en este trabajo.

Los PCRM estimados para *E. coli* en este estudio determinan una población resistente para los diferentes ABL con la incidencia siguiente: ampicilina 60,6%, carbenicilina 58,0%, cefazolina 5,5%, cefamandol 7,2%, ceftioxitina 4,0%, cefotaxima 2,5%, ceftazidima 2,7 y aztreonam 2,7%. No obstante, y teniendo en cuenta los valores de los PCSM, conviene resaltar la existencia de una "población sensible intermedia" correspondiente a la franja entre los PCSM y los PCRM, que verosimilmente podría conllevar

mecanismos de resistencia de bajo nivel o diferencias en la actividad intrínseca sobre diferentes cepas. La importancia de su incidencia: 15% para penicilinas y cefalosporinas de la 3ª generación y en torno al 25% para cefazolina, cefamandol y cefoxitina, radica en que esta población puede ser precursora de la población resistente que debería manifestarse como tal en el futuro. Asimismo sería positivo considerar esta población como potencialmente resistente en infecciones cuya localización impidiera la llegada del antibiótico en concentraciones elevadas.

Los PCRM considerados por nosotros están en armonía con los criterios de sensibilidad emitidos por las diferentes instituciones internacionales para las penicilinas y cefalosporinas de la 1ª y 2ª generación^{34,36-40,42,46}. Sin embargo, existe una notable discrepancia en relación con los puntos críticos de sensibilidad fijados para las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam. Tal discrepancia queda reflejada al considerar la casi absoluta ausencia de resistencia a estos ABL en la mayoría de las series recogidas en la literatura. Como hemos podido comprobar experimentalmente en este trabajo, diferentes mecanismos de resistencia en *E. coli*, esencialmente ligados a las Blas OXA-1 y a la hiperproducción de Bla cromosómica (Figura 3), determinan valores de CMI elevados pero inferiores a los puntos críticos tomados como límites para la sensibilidad.

La reciente aparición de cepas productoras de BPEA ocasiona la calificación errónea de estas cepas como sensibles⁵³², e infiere la necesidad de reconsiderar los puntos críticos internacionales para ajustarlos más a la "realidad microbiológica", distanciándolos de la "realidad farmacocinética" en la que asiduamente descansan. Como ejemplo ilustrativo en *E. coli*, la resistencia a cefotaxima obtenida por nosotros es del 2,56% de los aislamientos, mientras que considerando los valores recomendados por la BSAC británica³⁹ (1 ug/ml), por la SFM⁴⁰ (4 ug/ml) y por el NCCLS³⁴ (8 ug/ml), obtendríamos una incidencia de resistencia a cefotaxima de 1,3%, y 0,1% respectivamente. Tales discrepancias, que en *E. coli* no son muy llamativas, alcanzan cifras más elevadas para otros microorganismos, y en nuestra opinión suponen una subestimación peligrosa de la resistencia.

El análisis de los fenotipos de resistencia proporciona una información global sobre diferentes aspectos, más conveniente que la mera enunciación de porcentajes de cepas inhibidas, o que

los propios valores de CMI₅₀ y CMI₉₀. Realmente el patrón de sensibilidad-resistencia obtenido del fenotipo constituye una radiografía de los posibles mecanismos de resistencia implicados en cada caso. Esta forma de escudriñar la resistencia no es nueva y ha sido utilizada en los últimos 20 años por diversos autores que han confirmado su eficacia⁹⁻¹⁷. Este mismo año, Courvalin ha suscitado la "lectura interpretativa" del antibiograma basada en el análisis molecular de los posibles mecanismos de resistencia que subyacen en cada fenotipo de resistencia y su adecuada interpretación terapéutica². Para ello esboza 3 pasos que incluyen: la caracterización del fenotipo de resistencia en base a un número concreto de antibióticos de cada grupo; la deducción a expensas del fenotipo del mecanismo, o mecanismos, de resistencia; y la inferencia, a expensas del mecanismo de resistencia deducido, del fenotipo establecido previamente. Este inteligente planteamiento del problema, parte de la consideración de los antibióticos, más que como entes individuales, como miembros de grupos o familias, con características comunes en cuanto a estructura, mecanismos de acción y resistencia, y espectro de actividad.

Nuestro planteamiento de los fenotipos de resistencia parte de un enfoque coincidente, y considera como criterio discriminatorio de sensibilidad y resistencia microbiológica el PCRM para los 9 ABL estudiados. Con propósitos comparativos diferenciamos los fenotipos de resistencia clínica estructurados considerando el punto crítico farmacocinético (PCF), que en muchas ocasiones no es coincidente con el PCRM. De esta manera distinguimos fenotipos de resistencia microbiológica de fenotipos de resistencia clínica que son los habitualmente referidos en la mayoría de las series citadas anteriormente.

En *E. coli* se diferencian 11 fenotipos, inicialmente estructurados en 3 grupos en función de la sensibilidad-resistencia a ampicilina y carbenicilina (Tabla 5B). El fenotipo 1 engloba todas las cepas sensibles a los 9 ABL. Su incidencia del 39,4% se distancia de la obtenida en las series de Jarlier⁵³⁸ (67,4%), Sirot⁵³⁹ (64%), y Sirot⁵³² (60%), reflejando una mayor resistencia a la ampicilina en nuestro medio. Del total, más del 70% debería considerarse como población sensible de pleno derecho por estar delimitada por valores inferiores al PCSM, sin embargo, y esencialmente para cefalosporinas, algunos aisla-

mientos muestran valores de CMI que podrían conllevar mecanismos de resistencia de bajo nivel. La β la cromosómica constitutiva que poseen todas las cepas de *E. coli* y su bajo nivel de expresión debe responder, mayoritariamente, de este fenotipo. Dado el bajo nivel de resistencia inferido por otros mecanismos, y de forma más concreta por alteraciones en la permeabilidad de la ME, no sería erróneo suponer la presencia de estas cepas dentro de este fenotipo sensible^{109,122,140}.

El segundo grupo de fenotipos en *E. coli* tiene una incidencia del 58% correspondiente a los aislamientos resistentes a carbenicilina, que contrasta con las cifras inferiores ofrecidas en otras series^{532,538,539}. En él se diferencian 6 fenotipos de resistencia microbiológica y clínica distintos, que coinciden en su incidencia dada la similitud de puntos críticos de referencia. Las β las plasmídicas clásicas y en muy pequeña medida las nuevas BPEA son responsables de su configuración. En *E. coli* se han identificado 12 BPC diferentes, siendo TEM-1 la enzima predominante con una incidencia que fluctúa entre 49% y 96% y una media del 77% según las diferentes series^{216,261,262,325,542}. Estos datos están en contraposición con los obtenidos para TEM-2, con incidencia inferior al 2%; OXA-1 con una incidencia que oscila entre 2% y 16% y un valor medio del 6%; y SHV-1, reconocida en pocos estudios aunque tiene una incidencia media del 4%. No es infrecuente el hallazgo de dos y hasta tres BPC distintas en *E. coli*, siempre TEM-1 asociada generalmente a OXA-1, SHV-1 y PSE-1^{262,542}.

El fenotipo 2 con resistencia a ampicilina y carbenicilina y sensibilidad a todas las cefalosporinas y aztreonam es el más frecuente en *E. coli* (54,2%). Los fenotipos 3 y 4 con incidencia de 1,4% y 1,3% respectivamente, se diferencian por la resistencia a cefazolina y cefamandol. Sin duda un nivel gradual y progresivo de producción de β la plasmídica, esencialmente TEM-1, posibilita la discriminación entre ellos. Las características del que podríamos llamar "patrón TEM-1" están especificadas en las tablas 6 y 9A. Se caracteriza por valores de CMI superiores a 1024 ug/ml de ampicilina y carbenicilina y un amplio rango para cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, mientras que los nuevos ABL no se ven afectados aunque la producción de β la alcance los valores máximos obtenidos de 143,7 nmoles/sg/mg de proteína. La hiperproducción de TEM-1, que afecta también a

la actividad de los inhibidores de β la a las concentraciones usuales, es un fenómeno bien documentado^{319,543-546}, que teóricamente puede deberse a repeticiones del gen que codifica el enzima, a mutaciones en el promotor, o más verosimilmente a un elevado número de copias del plásmido que porta el gen. A este respecto, se ha demostrado la existencia de plásmidos no conjugativos de pequeño tamaño, entre 2,5 y 7,0 Kb, que al existir en un número de copias elevado, al menos 10 por cromosoma bacteriano, determinarían la síntesis de elevadas cantidades de β la⁵⁴⁷. En este perfil de sensibilidad TEM-1, el efecto del incremento del inóculo bacteriano tiene relevancia en relación con las penicilinas y las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, pero no respecto de cefoxitina, cefotaxima, cefpiroma, ceftazidima y aztreonam (Tabla 9B).

La situación es algo dispar al considerar el denominado "patrón OXA-1" (Tablas 7 y 9A). Está caracterizado por la resistencia a todas las penicilinas, aunque los valores de CMI no alcanzan cifras tan elevadas. Respecto de las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación las concentraciones precisas para la inhibición de cepas de *E. coli* con este perfil tampoco alcanzan los valores altos referidos para TEM-1³¹⁹. A subrayar la escasa eficacia de la cefuroxima, puesta de manifiesto por Huovinen⁵⁴⁸ en 1988, ratificada por nosotros en este trabajo experimental. Las oxacilinasas, en general, y de manera más específica OXA-1 muestran cierta actividad hidrolítica sobre algunas cefalosporinas de 3ª generación, puesta de relieve por valores superiores de CMI en torno a 1-2 ug/ml^{262,319}. Recientemente pudimos comprobar como la cefpiroma y en menor grado la cefotaxima, ceftizoxima y ceftriaxona se ven afectadas cuando la síntesis de β la se incrementa sobre las cantidades habituales⁵³¹. Los valores de CMI₉₀ se elevan hasta 2 ug/ml para cefotaxima y ceftizoxima, y hasta 16 ug/ml para la cefpiroma (Figura 3), sugiriendo una inactivación enzimática que pudimos demostrar experimentalmente mediante el test microbiológico de Masuda (Figura 5). De análoga forma existe un efecto de inóculo significativo para cefotaxima y cefpiroma, particularmente cuando se ensayan cepas con alto nivel de producción de OXA-1 (Tabla 9B).

El fenotipo 6, con incidencia inferior al 1%, se distingue por la resistencia a todos los ABL excepto cefoxitina y moxalactam. Hoy sabemos que corresponde al perfil típico de las nuevas β PEA

identificadas en todas las *Enterobacteriaceae* y más frecuentemente en *Klebsiella* y *E. coli* 207,277. Al menos 15 cepas mostraron este perfil encontrado, retrospectivamente, por primera vez en 1982. Un estudio prospectivo de todas las cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas en nuestro hospital entre 1988 y 1989 demostró que 21 aislamientos de *E. coli* codificaban β PEA: 7 cepas SHV-2, 6 cepas una β la con pI de 5.4 idéntico de TEM-1 pero distintas en cuanto a su perfil hidrolítico, y 7 cepas una β PEA de pI 5.9 compatible con TEM-6 y TEM-8⁵⁴⁹. Este fenotipo de nuevo destaca la necesidad de modificar los criterios habituales de sensibilidad para las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam, considerando puntos críticos de resistencia inferiores, nunca más elevados de 1 ug/ml.

El fenotipo 7 con resistencia a todos los ABL e incidencia inferior al 1% podría deberse a diferentes mecanismos de resistencia aislados o solapados en la misma cepa. La hiperproducción de β la cromosómica podría caber siempre que la CMI de carbenicilina superara los 32 ug/ml, situación por otra parte excepcional de acuerdo a nuestros datos y a los publicados por Roy et al⁵⁴². Una segunda posibilidad vendría dada por la yuxtaposición en una misma cepa de la hiperproducción de β la cromosómica con la presencia de alguna β la plasmídica, situación muy infrecuente en *E. coli* 539,542. Una tercera posibilidad, aún más rara, combinaría alguno de los mecanismos anteriores con alteraciones en la permeabilidad de la ME, que de por sí no conferiría valores tan elevados de CMI. Finalmente, la codificación de una cefamicinasa similar a la BIL-1 descrita en *E. coli* por Woodford et al.³⁶³ podría explicar un perfil de resistencia singular. Esta última no es una posibilidad desdeñable considerando el aislamiento en los últimos meses en nuestro hospital de 3 cepas con este perfil, cuyo mecanismo de resistencia está por dilucidar.

El tercer grupo de fenotipos en *E. coli* está singularizado por la divergencia en la actividad de ampicilina y carbenicilina. Descrito inicialmente por Medeiros et al.⁵³³ en 1974, se distingue por la resistencia a ampicilina y cefalotina y la sensibilidad a concentraciones de carbenicilina comprendidas entre 4 y 32 ug/ml. Su prevalencia, en nuestro caso del 2,6%, es distinta en función de las distintas series publicadas, y aunque en algún caso alcanza valores próximos al 20%, en general, es

inferior al 5% de los aislamientos^{261,325,532,538,541}. Estos índices bajos de prevalencia no restan protagonismo a un grupo de fenotipos, 4 en nuestra experiencia, con un mecanismo de resistencia atractivo en cuanto a su genética y características bioquímicas, del que es responsable la β la cromosómica de *E. coli*, y más específicamente su nivel de producción.

Todas las cepas de *E. coli* codifican una β la cromosómica constitutiva que puede diferir en su pI en los diferentes aislamientos. Matthew y Harris²⁰² caracterizan en *E. coli* 6 tipos de β las distintas con pI superior a 8.0. Marre y Aleksic⁵⁵⁰, individualizan 6 tipos diferentes con pI entre 7.4 y 8.8, de los que sólo los tipos A (pI 7.4), D (pI 8.3) y E (pI 8.6) se encuentran en las cepas resistentes a ampicilina. Su incidencia es muy diferente toda vez que las β las de los tipos A y D se identifican en 1 y 2 cepas de 51, mientras que el tipo F se encuentra en el 94,1% de las cepas resistentes.

La β la ampC de *E. coli* es el prototipo de enzima que se expresa de modo constitutivo. El gen estructural ampC determina una expresión enzimática pobre, o de bajo nivel, debida a un promotor ineficiente y a la acción de un atenuador entre el gen estructural y el promotor⁴⁰³. De esta manera, menos de la cuarta parte de la información transcrita por el promotor escapa a la atenuación y en estas condiciones difícilmente se pueden alcanzar niveles que provoquen resistencia. No obstante, se han descrito mutantes hiperproductores de β la que determinan grados progresivos de resistencia en función del nivel de enzima producido^{265,403-407}. La existencia de múltiples copias del gen ampC es la causa más frecuente de síntesis elevada, si bien el incremento de la tasa de transcripción por mutaciones que afectan al promotor ó atenuador también ha sido invocado^{265,405,-408}. Sea como fuere, la concentración de β la en el espacio periplásmico puede ser entre 2 y 20 veces mayor que la basal, ocasionando un incremento sustantivo de las CMIs de muchos ABL, entre ellos la ampicilina y las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, mientras que las carboxi y ureidopenicilinas se ven menos afectadas^{140,404,409}.

Este abanico de posibilidades responde de la diversidad de fenotipos de este grupo encontrados entre nuestros aislamientos. En los fenotipos 8, 9 y 10 la síntesis de β la está dentro de los límites discretos de hiperproducción, con afectación impor-

tante de la ampicilina, y CMIs intermedias para las cefalosporinas, con resistencia variable a cefazolina y cefoxitina. La divergencia entre los fenotipos 9 y 10 en cuanto a la actividad de cefazolina y cefamandol se debe a la mayor eficacia hidrolítica del enzima para cefazolina, considerando en conjunto los valores de la afinidad y la tasa de hidrólisis⁵⁵¹.

El último fenotipo, fenotipo 11, con incidencia del 1,9%, es el más interesante y está caracterizado por la hiperproducción constitutiva del enzima y la resistencia a todos los ABL, con la excepción de carbenicilina, con afectación de las cefalosporinas de 3ª generación excepto cefpiroma (Tabla 8 y 9A, y figura 3). Estas cepas muestran un efecto inóculo significativo para cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (Tabla 9B). Este último fenotipo de resistencia, también explicitado por Roy et al.⁵⁴² y Marre y Aleksic⁵⁵⁰, aunque no encontrado en otras series debido a los puntos críticos elevados, recalca la necesidad de modificar los criterios de sensibilidad respecto de los nuevos ABL. Por último parece conveniente subrayar que los perfiles de sensibilidad debidos a la producción incrementada de las β las más frecuentes en *E. coli*, TEM-1, OXA-1 y cromosómica, pueden diferenciarse en virtud de la actividad selectiva de cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y cefpiroma (Tabla 9A).

La variabilidad geográfica y la estabilidad en la incidencia, son dos características bien delimitadas en cuanto a la resistencia a ABL en *E. coli*. O'Brien lo puso de manifiesto en dos estudios internacionales amplios por él dirigidos en las décadas de los 70 y 80, en los que la resistencia a ampicilina osciló entre 16-73% y 17-72%⁵²⁸⁻⁵²⁹. Nuestros datos, obtenidos con un elevado número de cepas de un mismo hospital, parecen ratificar tales aseveraciones previas. Por una parte, la resistencia a ampicilina con un valor medio para los 10 años del 60, 6% y un intervalo que ha oscilado entre 53,2% y 64,9% de los aislamientos, contrasta con la obtenida en Francia⁵³² (40,6%), Italia⁵⁵² (34%), Bélgica⁵⁵³ (45%), Holanda⁵⁵⁴ (42%), Alemania⁵³⁰ (21,5%), EE.UU⁵³⁰ (30%), Japón⁵³⁰ (29%) y Australia⁵³⁰ (35%). Por el contrario, la resistencia a cefalosporinas de la 3ª generación (2,5%) está dentro de los límites que enmarcan los datos de otras series^{532, 553, 554}. Por otra parte, del análisis de nuestros datos en absoluto podemos considerar significativas algunas variaciones mínimas respecto de la incidencia de cepas resistentes de *E. coli* a los diversos ABL estudiados.

El análisis del coeficiente de correlación para el estudio de la evolución de la sensibilidad, considerando 4 antibióticos índice, así lo atestigua (Tabla 5C). No obstante, se puede apreciar un discreto incremento del aislamiento de cepas sensibles entre los años 1982-1984, que revierte en los años posteriores a cifras coincidentes con las obtenidas inicialmente en 1977.

2. SALMONELLA SPP. Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

La asociación del género *Salmonella* con la patología infecciosa y con la antibioterapia en los últimos 25 años, se ha caracterizado por la mayor participación de *Salmonella* en diferentes cuadros infecciosos con incremento de su incidencia, al menos en el mundo occidental⁵⁵⁵; por el aumento de la prevalencia de la resistencia a ampicilina, particularmente en especies otras que *S. typhi*⁵⁵⁶⁻⁵⁵⁹; por la ineficacia terapéutica de las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, en manifiesta discrepancia con su actividad "in vitro"; y por el hallazgo de cepas productoras de BPEA con resistencia a los nuevos ABL, con las excepción de las cefamicinas y carbapenems⁵⁶⁰⁻⁵⁶².

Los microorganismos del género *Salmonella*, ampliamente distribuidos en la naturaleza, causan una patología diversa a expensas, esencialmente de la ingestión de agua y alimentos contaminados. El espectro clínico de la infección por *Salmonella* es versátil, y va desde infecciones gastrointestinales de escasa repercusión clínica, hasta procesos invasivos graves, bacteriemia y sepsis, osteomielitis, infecciones biliares e infecciones del tracto urinario⁵⁶³. A tal diversidad patológica responde la incidencia del aislamiento de *Salmonella* en muestras clínicas. En nuestra experiencia, aproximadamente un 85% de las cepas clínicas se obtuvieron de coprocultivos, 11% de hemocultivos, y el 4% restante de diversas muestras, orina, líquidos orgánicos y exudados⁵⁶⁴.

De los 2.164 aislamientos incluidos en este trabajo, solamente 177 (8,17%) corresponden a *S. typhi*, caracterizada por la elevada sensibilidad a ampicilina (98,3%). Del resto, 16,0% se identificaron como *S. typhimurium* y 75,87% pertenecen a las diferentes serovariedades que integran *S. enteritidis*. Su tasa media de resistencia a ampicilina en los 10 años fue de 6,2%,

en franca contraposición al 46% obtenido pocos años después en un hospital de nuestra misma zona geográfica⁵⁵⁹. El intervalo de incidencia de resistencia a ampicilina osciló entre un valor máximo de 10,2% en 1978 y 1,3% en 1981, para alcanzar al final del periodo de estudio cifras próximas a las iniciales. Estos parámetros y la ausencia de significación obtenida del análisis del coeficiente de correlación nos permite afirmar que en nuestro hospital, y entre los años 1997-1986, la resistencia a ampicilina y otros ABL fue baja y se ha mantenido de manera estable.

La distribución de *Salmonella* respecto de las CMIs a los diversos ABL es ciertamente diferente de la obtenida para *E. coli*, no obstante compartir mecanismos de resistencia cualitativamente similares, esencialmente TEM-1 (Figuras 6 y 7). Sin duda, la distinta incidencia de cepas con estos mecanismos responde de esta divergencia. Para ampicilina, carbenicilina, y en menor medida para cefazolina y cefamandol, la distribución es bimodal y se acomoda bien a un polinomio de 3º grado, que facilita el cálculo de los PCSM y PCRM, ajustados, con la ligera excepción de carbenicilina, a las abscisas máxima, de inflexión y del 95% (Tabla 14A). En función de los PCRM, se delimitan dos poblaciones: una amplia, formada por más del 90% de los aislamientos, que constituiría la población sensible, y otra pequeña, pero nítidamente diferenciada respecto de ampicilina y carbenicilina, y menos respecto de cefazolina y cefamandol, que integraría la población resistente.

La distribución en relación con cefoxitina, aztreonam y las cefalosporinas de 3ª generación es prácticamente monomodal y se ajusta mejor a un polinomio de 2º grado que también permite un cálculo ajustado de los puntos críticos respectivos (Tabla 14A). La población es bastante uniforme y se encuentra delimitada por valores de CMI muy próximos, con una población "resistente" o mejor "menos sensible" exigua. Las respectivas cifras de resistencia para los distintos ABL en función de los puntos críticos serían: ampicilina 6,3%, carbenicilina 6,1%, cefazolina 1,6%, cefamandol 2,4%, cefoxitina 0,2% y cefalosporinas de 3ª y aztreonam entre 0,1 y 0,4%.

Como en *E. coli*, en *Salmonella* se diferencian tres grupos de fenotipos esenciales en función de la actividad de ampicilina y carbenicilina. La diferencia básica radica en los mucho más li-

mitados fenotipos en *Salmonella* y en su distinta incidencia (Tabla 14B). El fenotipo 1, el más frecuente en *Salmonella*, sensible a todos los ABL, alcanza una incidencia del 93,7% y en él se incluyen los aislamientos sensibles a ampicilina. Se ha estudiado poco la influencia que la producción de β la cromosómica constitutiva tiene en *Salmonella*. No obstante, en este fenotipo hay una proporción reducida de cepas con CMIs superiores a las delimitadas por el PCSM, que podrían inferir la presencia de algún mecanismo de resistencia de bajo nivel, probablemente relacionado con alteraciones en las porinas^{121, 143}.

Los fenotipos 2, 3 y 4 conforman el segundo grupo caracterizado por la resistencia a ampicilina y carbenicilina, con resistencia variable, aún cuando baja, a cefazolina y cefamandol. Su incidencia global del 6,1% debe atribuirse a la codificación de β las plasmídicas clásicas, esencialmente TEM-1 y OXA-2, y la diferenciación entre los tres fenotipos debe ser debida al diferente nivel de producción, que como en *E. coli* infiere cierto grado de resistencia a cefazolina y cefamandol, cuando el nivel de producción se incrementa por la presencia de plásmidos multicopia. La síntesis de TEM-1 por *S. paratyphi* R7268 fue descrita en 1965 por Datta y Kontomichalou¹⁹⁸ en la primera referencia de una β la codificada por elementos extracromosómicos. Después, en *S. typhi*, se caracterizaron TEM-1 y OXA-2, y en otras especies TEM-1, TEM-2, OXA-1, OXA-2, SHV-1 y PSE-1^{203, 209, 261, 262, 565}. Es notable la coincidencia entre la producción de β las plasmídicas por cepas de origen humano y animal, que revela problemas de resistencia cruzada y transmisión horizontal de la resistencia^{261, 262}. Medeiros²¹⁶, en un estudio con 370 cepas resistentes a ampicilina de origen humano y animal de diversa procedencia geográfica, resalta la mayor incidencia de TEM-1 (69%) con relación a OXA-2 (14%), SHV-1 (10%), TEM-2 (3%), OXA-1 (1,3%) y PSE-1 (1%).

Entre nuestras cepas aisladas entre 1977 y 1986, no hemos encontrado un fenotipo de resistencia atribuible a β PEA que conllevara resistencia a nuevos ABL. No obstante, en 1989 detectamos una pequeña epidemia de cepas de *S. arizonae* con una β PEA de pI 5.9 compatible con TEM-6 o TEM-8, que ocasionaba amplia resistencia excepto a temocilina, cefamicinas y carbapenems⁵⁶⁰. Este hecho, previamente descrito en *Salmonella*²⁰⁷, ha sido ratificado con posterioridad al aislarse *S. kedougou* y *S. mbandaka* que codificaban TEM-3 y CTX-2 respectivamente^{561, 562}. Estos

hallazgos ponen de relieve, como en *E. coli*, la necesidad de reconsiderar los puntos críticos de sensibilidad para los nuevos ABL, y ratifican la conveniencia de tomar como tales valores de CMI inferiores a 1 ug/ml, en concordancia con los establecidos por nuestro trabajo experimental.

Un último fenotipo de resistencia en *Salmonella*, el fenotipo 5, caracterizado en 4 aislamientos, presupone sensibilidad a carbenicilina y resistencia a 8 ug/ml de ampicilina, cefazolina y cefoxitina, a 4 ug/ml de cefamandol, y "menor sensibilidad" a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. Este patrón de resistencia, demostrado y comentado en *E. coli* en virtud de la síntesis elevada de β la cromosómica constitutiva, no ha sido referido en la literatura, y podría constituir un hallazgo en *Salmonella*. Que pueda ser debido a mutaciones que afecten a un gen similar al ampC de *E. coli*, o a la disminución de la permeabilidad de la ME, por el momento entra dentro del campo de la hipótesis, y está por esclarecer.

3. SHIGELLA SPP. Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

Shigella es casi sinónimo de patología infecciosa gastrointestinal; de elevada tasa de resistencia a ampicilina por producción de β la TEM-1; y, muy frecuentemente, de país subdesarrollado. Bajo estas coordenadas y en la proximidad bioquímica y genética a *E. coli*, se enmarca la relación de esta especie de la familia *Enterobacteriaceae* con los ABL.

Los microorganismos del género *Shigella*, particularmente *S. dysenteriae* y *S. flexneri*, son los agentes causales de la disentería bacilar, enfermedad infecciosa invasiva de la mucosa del colon, y de procesos de gravedad menor, gastroenteritis que cursan con diarrea, asociados más frecuentemente a *S. sonnei*⁵⁶⁶. Su participación en procesos sistémicos es reducida y limitada casi a la bacteriemia⁵⁶⁷. En nuestra experiencia son escasos los aislamientos de *Shigella* de hemocultivos, y los 401 cepas incluidas en este estudio: 89,5% *S. sonnei* y 10,5% *S. flexneri* proceden de coprocultivos. No obstante estas cifras, hemos de señalar que el aislamiento de *Shigella* en nuestro medio se ha reducido enormemente hasta ser considerado hoy, "una rareza microbiológica".

En nuestra serie, 64,1% y 63,1% de los aislamientos de *Shigella* mostraban resistencia a niveles elevados de ampicilina y carbenicilina respectivamente. Mientras, la resistencia a cefazolina y cefamandol era baja, en torno al 1%, la de cefoxitina y cefalosporinas de 3ª generación, menos del 1%, prácticamente testimonial. Tal perfil de sensibilidad configura una distribución bimodal para ampicilina y carbenicilina, bastante superponible gráficamente a la de *E. coli*, que se acomoda matemáticamente a un polinomio de 3º grado (Figura 8). Se diferencian, por tanto, con nitidez, dos poblaciones separadas por una amplia franja de CMIs carente de aislamientos para carbenicilina y con una incidencia muy reducida para ampicilina (2,9%).

Los puntos críticos de sensibilidad y resistencia obtenidos de la aplicación matemática son próximos a los de *E. coli* y guardan una excelente correlación con las abscisas máxima y del 95% incluso para carbenicilina (Tabla 19A). Respecto del resto de ABL, la distribución es monomodal como corresponde a la presencia de una sola población, aunque en cefazolina y cefamandol puede advertirse una simbólica población menos sensible (Figuras 8 y 9). Una ecuación de 2º grado representa matemáticamente tal distribución, con puntos críticos superponibles, ± 1 dilución, a los obtenidos para *E. coli* (Tabla 19A).

Con este esquema, la diferenciación de fenotipos de resistencia es similar a la esbozada en *E. coli* y *Salmonella*, aunque como en esta última el número de fenotipos es inferior. La tasa elevada de resistencia a ampicilina y carbenicilina determina la prioridad en la incidencia del 2º grupo de fenotipos. Del 63,1% de incidencia global del grupo la mayoría de los aislamientos, 62,2%, se acomodan en el fenotipo 2 sensible a todas las cefalosporinas y aztreonam. No obstante, 0,9% de las cepas muestran resistencia incrementada a cefazolina y cefamandol, verosimilmente por un proceso de hiperproducción de β la TEM-1 similar al descrito para *E. coli* y *Salmonella*. En *Shigella*, está bien documentada desde 1970 la síntesis de TEM-1203,209,211. Posteriormente, se identificaron en este microorganismo TEM-2 y PSE-1, y en una cepa de *S. sonnei* está descrita la síntesis combinada de TEM-1 y PSE-1262. Por el momento, no se han caracterizado β PEA, y en relación con este punto nuestra proposición, extraída de los datos experimentales, también sugiere la disminución de los puntos críticos aceptados internacionalmente,

hasta valores inferiores a 0,5 ug/ml para cefotaxima, ceftazidima, moxalactam y aztreonam.

Todas las cepas de **Shigella** codifican una β la cromosómica constitutiva de pI 8.2, de gran homología con la de **E. coli** 209, 263. Esta enzima se ha identificado en los aislamientos de **Shigella** sensibles a ampicilina que en nuestra experiencia dan lugar al fenotipo 1, sensible a todos los ABL, con una incidencia de aislamiento del 35,9%. También esta β la cromosómica puede mediar resistencia⁵⁶⁸. De forma análoga a **E. coli**, aunque con menor incidencia (1%), se individualizan los fenotipos 5 y 6 caracterizados por la resistencia disociada ampicilina/carbenicilina y la afectación del resto de los ABL, incluyendo en 2 cepas, las cefalosporinas de 3ª generación.

Como en **E. coli**, la hiperproducción enzimática es la responsable de este último fenotipo. La existencia de múltiples copias del gen ampC es la causa más frecuente de producción elevada, si bien el incremento de la tasa de transcripción por mutaciones que afectan al promotor ó atenuador también ha sido involucrado^{263, 265, 405, 408}. La resultante es la síntesis constitutiva de elevadas cantidades de β la que afectan a todos los ABL, aunque en menor medida a las carboxi y ureidopenicilinas. Aunque la inactivación de los nuevos ABL debe producirse con CMIs inferiores a las mostradas para **E. coli** con un mecanismo similar, este hecho constituye otra buena razón para considerar puntos críticos inferiores a los aceptados por las entidades internacionales relacionadas con los problemas de la resistencia microbiana.

La elevada tasa de resistencia a ampicilina entre nuestros aislamientos de **Shigella**, oscilante entre 25% y 93,4% con un valor medio del 63,6%, es inferior a la de países donde las infecciones por este microorganismo son prácticamente endémicas, y algo superior a la de otros países desarrollados de nuestro entorno^{569, 570}. De acuerdo con nuestros datos, la evolución de la resistencia a ampicilina muestra una evidente tendencia hacia la resistencia, como se desprende del valor claramente negativo del coeficiente de correlación para la concentración de 4 ug/ml, y del análisis de la propia evolución del porcentaje de aislamientos sensibles en 1977 (75%) y los que en años sucesivos revelaban los estudios de sensibilidad.

4. PROTEUS MIRABILIS Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

Tanto desde la perspectiva microbiológica como desde la más estrictamente clínica, *P. mirabilis* es un microorganismo con connotaciones que lo aproximan a *E. coli*. Su implicación en la patología infecciosa es amplia en lo referente a infecciones comunitarias y nosocomiales, aunque cuantitativamente se aísla con una frecuencia inferior a la de *E. coli*. Por otra parte, su patrón de sensibilidad a los antimicrobianos remeda fenotípicamente al de *E. coli*, aunque la incidencia de resistencia a ampicilina y otros ABL es inferior.

P. mirabilis está más frecuentemente asociado a infecciones del tracto urinario, relacionadas con anomalías estructurales renales y de las vías urinarias, instrumentación, cirugía o cateterización⁵⁷¹. En relación con ellas, *P. mirabilis* también se ha visto involucrado en la infección postquirúrgica, sepsis y bacteriemia, y en la infección en el paciente quemado. La tasa global de infecciones por *Proteus spp.* en los hospitales de EE. UU alcanza valores próximos al 8%, con una mayor participación de *P. mirabilis*⁵³⁰. Esta incidencia de aislamiento se distribuye: 8,6% en infecciones del tracto urinario, 7,4% en infecciones de heridas, fundamentalmente quirúrgicas, y 3,1% en infecciones de la sangre. En nuestro medio, con datos obtenidos entre los años 1980-1985, *P. mirabilis* se ha aislado como agente causal del 10,7% de las infecciones urinarias, 5,8% de las infecciones de heridas y tejidos blandos, y 2,7% de las bacteriemias⁵⁷².

El 57,9% de nuestros 2.473 aislados de *P. mirabilis* son sensibles a ampicilina, incidencia en armonía con la obtenida en Italia⁵⁵², e inferior a la obtenida en EE.UU⁵³⁰ (84%), Francia⁵³² (73%), Bélgica⁵⁵³ (84%), Holanda⁵⁵⁴ (81%). El resto de los ABL ensayados en nuestro estudio son más activos, con un 77,2% de aislamientos sensibles a carbenicilina, 86% y 84% sensibles a cefazolina y cefamandol, y más del 99% sensibles a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. Estas cifras ponen de relieve una mayor eficacia de TEM-1, la βla más frecuentemente relacionada con la resistencia de *P. mirabilis* a los ABL, frente a ampicilina, y una incidencia de cepas con un nivel mayor de producción enzimática respecto de *E. coli*, como lo evidencia la mayor tasa de resistencia a cefazolina y cefamandol en *P. mirabilis*. Por otra parte, debemos remarcar la ausencia del fe-

notipo de resistencia ligado a la producción de SPEA, hecho común en esta especie^{277,361,362}, y la ausencia de modificaciones importantes en la tasa de resistencia durante los 10 años que alcanza este estudio.

La distribución de los aislamientos de *P. mirabilis* en el rango de CMIs muestra un carácter bimodal manifiesto para ampicilina, carbenicilina, cefazolina y cefamandol, y mucho menos marcado para la cefoxitina y las cefalosporinas de 3ª generación (Figuras 10 y 11). Por tanto, el polinomio de 3º grado se acomoda bien a todos los antimicrobianos, aunque para cefoxitina, dado su más estrecho margen de CMIs, es más adecuado el de 2º grado. En relación con ello, para los 4 primeros antimicrobianos se diferencian con nitidez dos poblaciones, una que podríamos etiquetar como población sensible, y otra que evidencia la presencia de mecanismos de resistencia eficaces. Respecto del resto, la población parece más homogénea, con una exigua población menos sensible que revela la resistencia a los mecanismos de resistencia más comunes en *P. mirabilis*.

La interrelación entre ampicilina, carbenicilina, cefazolina y cefamandol parece clara y ya ha sido puesta de manifiesto en otro estudio que incluye buena parte de las cepas aquí consideradas⁵⁷². No obstante, la distribución de aislamientos, nítida en cuanto a ampicilina, está algo menos diferenciada respecto de carbenicilina, cefazolina y cefamandol, por la existencia de una población intermedia extensa localizada entre los PCSM y PCRM obtenidos. Este hecho, probablemente podríamos interpretarlo asumiendo que en un grupo numeroso de cepas de *P. mirabilis* los valores de CMI inferidos por la codificación de TEM-1 son inferiores a los obtenidos para la misma enzima en otras *Enterobacteriaceae*, aunque paradójicamente la incidencia de cepas con un nivel más elevado de producción de TEM-1 sea mayor en esta especie. La existencia de esta relativamente amplia población intermedia explica, en buena medida, los valores elevados de los PCRM para carbenicilina (128 ug/ml) y cefazolina (32 ug/ml).

La diferenciación de tres grupos amplios de fenotipos delimitados por la actividad de ampicilina y carbenicilina también es adecuada a *P. mirabilis* (Tabla 24B). El fenotipo 1, sensible a todos los ABL se caracteriza en casi el 60% de los aislamien-

tos; esta incidencia es inferior a la publicada en otras series que alcanzan entre 73,2% y 84,8% de la totalidad^{532,538,539}. En consecuencia, la incidencia del 2º grupo de fenotipos de resistencia, fenotipos 2 al 6, es más baja en estas últimas publicaciones. Los mecanismos de resistencia implicados en estos fenotipos incluyen la producción de β las plasmídicas clásicas, esencialmente TEM-1 y en menor proporción TEM-2, aunque en *P. mirabilis* también se han identificado SHV-1, HMS-1, OXA-1 y 2, PSE-1, N-3, N-29 y CEP-2^{203,206,209,216,262}. En esta especie es notable la discrepancia entre la producción cuantitativa de TEM-1 y TEM-2 y los diferentes perfiles de resistencia⁵⁷². Así, la producción enzimática es baja (7,5 U/mg de proteína) en el fenotipo sensible a todas las cefalosporinas (9,1% de incidencia), y mucho más elevada (382,6 U/mg de proteína) en el fenotipo 4 (12,4% de incidencia) que lleva asociada la resistencia a cefazolina y cefamandol.

En nuestra experiencia, en *P. mirabilis* es un hecho la existencia de un grupo de fenotipos, 7 al 11, con incidencia del 19,3 %, caracterizados por la resistencia disociada a ampicilina y carbenicilina, del que no existen referencias en la literatura otras que las publicadas por nosotros^{540,572}. En la gran mayoría de estas cepas (17,5%), se observa resistencia a ampicilina y sensibilidad al resto de los ABL. Sin duda es un grupo de fenotipos similares en su configuración a los detectados y bien conocidos en *E. coli*, aunque los mecanismos de resistencia deben ser diferentes. De hecho en *E. coli* la responsabilidad exclusiva de este patrón de resistencia descansa en la síntesis constitutiva de cantidades moderadas o muy elevadas de β la cromosómica a expensas de alteraciones en el gen *ampC*.

En *P. mirabilis* no están descritas tales anomalías, aunque como en todos los bacilos gram-negativos la codificación de una β la cromosómica constitutiva es un hecho^{209,309,310}. Por otra parte, y no sin sorpresa, en alguna de nuestras cepas de *P. mirabilis* se ha documentado la producción de TEM-1, aún en escasa cantidad (4,1-10,5 U/mg proteína), en fenotipos que muestran sensibilidad a carbenicilina y cefazolina, y también en fenotipos que sensibles a carbenicilina son resistentes a cefazolina y cefamandol (14,1 U/mg proteína)⁵⁷². Probablemente en estas cepas no se pueda descartar rotundamente la producción más elevada de β la cromosómica, más difícil de visualizar en el IEE

tras la sonicación. De forma más evidente tal hipótesis parece más verosímil en los escasos aislamientos que conforman el fenotipo 11, en el que la resistencia a bajas concentraciones de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y moxalactam está demostrada. La exclusión de resistencia a carbenicilina en este fenotipo abunda en la hipótesis de un mecanismo cromosómico de producción de β la.

Finalmente, conviene reseñar la existencia de un patrón, fenotipo 10, en el que está dissociada la sensibilidad a carbenicilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, de la resistencia a bajas concentraciones de cefoxitina y moxalactam. Sin menoscabo de la presencia de un mecanismo hidrolítico común de bajo nivel, estas cepas podrían tener alteraciones en la permeabilidad, toda vez que en microorganismos del género *Proteus* se ha demostrado la existencia de una sola porina fundamental^{110,122}, y mutaciones que afectaran a su permeación excluirían mejor los metoxi-ABL por su mayor tamaño molecular.

5. KLEBSIELLA SPP. Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

Los microorganismos del género *Klebsiella*, esencialmente *K. pneumoniae*, la especie más prevalente, constituyen un modelo de adaptación progresiva a la convivencia con los ABL. Durante los 60 años de la era de los antibióticos, *K. pneumoniae* y en menor grado *K. oxytoca* han desarrollado el mayor número de mecanismos hidrolíticos eficaces de resistencia a los ABL. Este género no sólo ha sido pionero en la resistencia de amplio espectro a penicilinas, y en menor grado a cefalosporinas, mediante la síntesis de β las cromosómicas constitutivas de amplio espectro, sino que *K. pneumoniae* es la especie en la que más β las plasmídicas, clásicas y de espectro ampliado, se han identificado. Aunque, afortunadamente, en *Klebsiella* no se han caracterizado enzimas inducibles, el habitual solapamiento de mecanismos hidrolíticos en una misma célula, conlleva algunas dificultades para discernir en cada caso el mecanismo de resistencia de mayor trascendencia.

La resistencia "natural" a penicilinas en *Klebsiella* fue bien documentada muy poco después de la introducción de la ampicilina y la carbenicilina en la práctica clínica⁵⁷³. La responsabi-

lidad de las *β*las cromosómicas constitutivas de amplio espectro, conocidas específicamente como "*β*las de *Klebsiella*" 206, se dilucidó después. Se han caracterizado distintas *β*las cromosómicas, similares en sus propiedades, en 3 especies muy relacionadas: *K. aerogenes* 202, 209, 273, 454, 495, *K. pneumoniae* 209, 496, 497 y *K. oxytoca* 498-500. Son enzimas de amplio espectro aunque hidrolizan las penicilinas con mayor eficacia. La denominada K1, muestra mayor perfil hidrolítico afectando al aztreonam^{272, 273, 497-500}. Además, en *K. pneumoniae* y en menor proporción en *K. oxytoca*, se han identificado 10 *β*las plasmídicas clásicas, con predominio de SHV-1 (61%-94%) y TEM-1 (10%-46%)^{216, 261, 262, 309, 324}, y más de 30 nuevas *β*PEA que incluyen en su espectro todos los ABL con la excepción de los carbapenems²⁰⁷⁻²⁷⁷. Con este amplio panel de posibilidades hidrolíticas, el análisis de la resistencia a ABL en *Klebsiella* y la diferenciación de fenotipos es una tarea con marcada dificultad.

La gráfica que representa la distribución de los aislamientos de *Klebsiella* respecto de ampicilina y carbenicilina, aunque con cierto matiz bimodal, permite la diferenciación de tres poblaciones (Figura 12). La primera, con una incidencia global próxima al 70% de los aislamientos, podríamos considerarla como la población "natural" comprendida entre 0,5 y 64 ug/ml para ampicilina y 4 y 512 ug/ml de carbenicilina. En ella la síntesis progresivamente incrementada de *β*la cromosómica constitutiva da lugar a dos subpoblaciones, 10% y 60% de incidencia, separadas por una concentración de 16 y 64 ug/ml, respectivamente para ampicilina y carbenicilina.

La segunda población, en la que se incluyen menos del 5% de las cepas, estaría delimitada por CMIs de 64-256 ug/ml de ampicilina y 1024 ug/ml de carbenicilina, y en ella es muy verosímil el solapamiento de mecanismos cromosómicos de alto nivel y plasmídicos de nivel reducido, dados los valores de CMI⁵⁴². En la tercera población, formada por el 25% de los aislamientos y delimitada por CMIs superiores a 256 ug/ml de ampicilina y 1024 ug/ml de carbenicilina, parece más común la participación de *β*las plasmídicas, aunque en absoluto se puede descartar la hiperproducción de *β*la cromosómica de amplio espectro, particularmente en *K. oxytoca*⁵⁴². Considerada esta distribución de poblaciones tan peculiar, la aplicación del modelo matemático mediante un polinomio de 3º grado determina puntos críticos ele-

vados que estimamos necesario corregir, considerando valores inferiores a los del PCSM, 16 y 64 ug/ml para ampicilina y carbenicilina, como más adecuados para la diferenciación de los fenotipos de sensibilidad.

La distribución de aislamientos para cefazolina y cefamandol es menos compleja, tiene un caracter bimodal que también se acomoda a un polinomio de 32 grado, y asimismo permite la diferenciación de tres poblaciones (Figura 12). En la primera, delimitada por los PCSM, se incluyen algo más del 50% de los aislamientos y correpondería a la "población natural" de *Klebsiella* o población sensible de pleno derecho, en la que la producción de β la cromosómica constitutiva es de tal entidad que no afecta sensiblemente la efectividad de estos antimicrobianos. Una segunda población, que alcanza una incidencia en torno al 25%, estaría formada por cepas con CMIs entre 2 y 16 ug/ml, y un nivel más elevado de β la cromosómica de amplio espectro, sin descartar la presencia de cepas codificadoras de un nivel bajo o moderado de β la plasmídica⁵⁴². La tercera población, resistente y segregada a expensas de los PCRM, con CMIs superiores a 16 ug/ml para ambos antibióticos, la integrarían el 20% de los aislamientos de *Klebsiella*, y en ella la yuxtaposición de mecanismos cromosómicos y plasmídicos de alto nivel parece una posibilidad real dados los elevados valores de CMI que pueden superar los 256 ug/ml.

Respecto de cefoxitina, cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam, la distribución no difiere cualitativamente de la anterior, aunque en términos cuantitativos la población resistente es muy inferior (Figura 13). Tiene un marcado caracter bimodal, ajustado a polinomios de 32 grado, con una extensa población sensible superior al 70%, una población "moderadamente sensible" más amplia para cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, y una población resistente que oscila entre 1,5% para moxalactam y 6,5% para aztreonam, en la que la participación de β las del tipo K1 y de espectro expandido parece una realidad. De nuevo en *Klebsiella* como en otras *Enterobacteriaceae*, o quizá con más énfasis, es imprescindible la asunción de PCRM bajos para estos ABL (Tabla 29B), entre 0,2 y 1 ug/ml, que permitan la diferenciación de estas cepas sin correr el riesgo de etiquetar erróneamente como sensibles aislamientos con mecanismos eficaces de resistencia, esencialmente ligados a la producción de β PEA⁵³².

Las referencias de diferentes países sobre la resistencia de *Klebsiella* a ampicilina revelan índices de prevalencia superiores al 90% de los aislamientos^{527-530, 532, 552-554}. Por tanto, el fenotipo 1, sensible a todos los ABL, es un fenotipo de sensibilidad infrecuente⁵²⁶ que representa la población más sensible dentro de la naturalmente resistente, y que en nuestra serie supone el 10,2% de los aislamientos. La producción de niveles muy bajos de β la cromosómica de amplio espectro determina valores de CMI que no superan los 16 ug/ml de ampicilina y 64 ug/ml de carbenicilina.

Los fenotipos más usuales en *Klebsiella* (88,2%), fenotipos 2 al 8 (Tabla 29B), llevan implícita la resistencia a ampicilina y carbenicilina y se diferencian por la resistencia disociada a las diferentes cefalosporinas motivada por la presencia de distintas β las con diferente nivel de producción. No sólomente son los fenotipos más frecuentes en nuestra experiencia, sino que en la mayoría de las series publicadas alcanzan porcentajes superiores al 90%, y en alguna son los únicos reconocidos^{532, 537-540}.

Entre ellos, el más frecuente, fenotipo 2, tiene una incidencia del 68,3% del total de aislamientos, se caracteriza por CMIs de cefazolina y cefamandol entre 1 y 16 ug/ml, y la presencia de niveles intermedios de β la cromosómica de amplio espectro, aunque una proporción relativamente importante de estas cepas pueda codificar β las plasmídicas clásicas, esencialmente SHV-1 y TEM-1^{309, 324, 542}. Mientras que en *K. oxytoca*, que supone el 11,5% de nuestros aislamientos, la producción de β las plasmídicas es bastante infrecuente⁵⁴², en *K. pneumoniae*, 88,3% de los aislamientos incluidos en este estudio, la síntesis de SHV-1 y en menor proporción de TEM-1 son habituales^{309, 324, 542}. La producción de cantidades elevadas de estas enzimas acarrea, como en *E. coli* y por motivos verosimilmente idénticos, un incremento notable de las CMIs para cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. A este perfil de resistencia responden el 13,7% de nuestras cepas de *K. pneumoniae* en lo que hemos considerado el fenotipo 4, segundo fenotipo más prevalente en *Klebsiella*⁵³⁸.

La implicación de β las con espectro expandido que causan resistencia a los nuevos ABL no es infrecuente en *Klebsiella*^{207, 272, 273, 277}. En nuestra experiencia se diferencian los fenotipos 6 y 7 con incidencia del 1,4% y 1,6% del total. Desde un punto de

vista teórico deberían responder a la producción de β la K1 por cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* que afecta esencialmente a aztreonam, y a la síntesis de β PEA por cepas de *K. pneumoniae* que afectan a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, pero no a cefoxitina y moxalactam. Esta suposición, fruto del examen retrospectivo, la hemos ratificado mediante el estudio prospectivo de todas las cepas de *Enterobacteriaceae* con un patrón de sensibilidad compatible, aisladas a partir de 1988⁵⁴⁹. En 8 aislamientos con perfil superponible al fenotipo 6 siempre identificamos una β la de características coincidentes con la β la K1. Asimismo, hemos encontrado 19 cepas de *K. pneumoniae* productoras de β la SHV-2, con un patrón absolutamente coincidente con el que distingue al fenotipo 7. La identificación de estos aislamientos ha sido más fácil por la estimación de PCRM inferiores a 1 ug/ml para cefotaxima, ceftazidima y aztreonam.

La resistencia disociada a ampicilina y carbenicilina, común en otras *Enterobacteriaceae* es muy infrecuente en *Klebsiella*. Sólomente el 1,6% de nuestras cepas podrían incluirse en este grupo, dando lugar a 4 fenotipos. Entre ellos el fenotipo 12, con resistencia a todos los ABL excepto carbenicilina, podría ser similar al fenotipo 8 que muestra resistencia sin exclusión alguna. La hiperproducción de β la cromosómica sumada a alteraciones en la permeabilidad de la ME, podría explicar un patrón de resistencia real aunque extraordinariamente infrecuente.

6. YERSINIA ENTEROCOLITICA Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

La patología infecciosa causada por *Y. enterocolitica* está asociada, generalmente, a infecciones del tracto gastrointestinal: gastroenteritis que cursan con fiebre, diarrea y dolor abdominal; o cuadros más graves de enterocolitis con lesiones ulcerativas de la mucosa intestinal⁵⁷⁴. Como norma, la afectación sistémica es muy limitada, aunque la bacteriemia y sepsis es bien conocida⁵⁷⁵.

Al parecer, todas las cepas de *Y. enterocolitica* codifican dos β las cromosómicas diferentes en su expresión, en su pI y en su perfil de sustrato, a las que atribuir el patrón de resistencia, muy uniforme por lo general, a ABL^{576, 577}. La β la tipo A es una enzima constitutiva de pI 8.1-8.3, con un perfil de sustrato caracterizado por la hidrólisis específica de ampici-

lina, cefalosporinas de 1ª generación, y en menor grado carbenicilina. La β la tipo B es, por el contrario, inducible, de pI 5.4, y con un perfil de sustrato más típico de cefalosporinasa. Por otra parte, en *Y. enterocolítica* se ha identificado TEM-1200,203,209, aunque en un número muy escaso de cepas, y por el momento, no se han caracterizado β PEA activas frente a cefalosporinas de 3ª generación y monobactams^{207,277}. En *Y. enterocolítica*, Brzostek et al.⁵⁷⁸, han correlacionado la pérdida de las porinas OmpC y OmpF con la disminución del grado de sensibilidad a algunas cefalosporinas. En *Y. enterocolítica*, que no dispone de mecanismos hidrolíticos de gran eficacia, la disminución de la permeabilidad por alteraciones de la ME tal vez podría tener más relevancia que en otras *Enterobacteriaceae* con mecanismos de resistencia más eficaces.

Y. enterocolítica muestra un antibiotipo uniforme y mantenido en el tiempo, singularizado por un grado de resistencia moderado a ampicilina, carbenicilina y cefazolina, y sensibilidad a la asociación de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, monobactams y carbapenems^{575,579,580}. Nuestros resultados obtenidos con 103 cepas de *Y. enterocolítica* son coincidentes con ese patrón que vendría definido por CMIs modales de: ampicilina (32-128 ug/ml), carbenicilina (256 ug/ml), cefazolina (32-128 ug/ml), cefamandol (4-8 ug/ml), cefoxitina (2-4 ug/ml) y cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam (0,06-1,2 ug/ml).

Esta disposición de los aislamientos, siempre en un estrecho margen de CMIs, permite hacer algunas matizaciones. En principio parece existir una distribución bimodal asumida matemáticamente por una ecuación de 2º grado, que al menos para ampicilina, carbenicilina y cefazolina, hace posible distinguir dos poblaciones (Figura 14). La primera sería la "población natural" moderadamente sensible, o tal vez mejor moderadamente resistente, y delimitada por los PCSM: 64 ug/ml para ampicilina y cefazolina y 256 ug/ml para carbenicilina. Además existe una segunda población con un grado de resistencia mayor y CMIs en torno al PCRM, en la que la producción más elevada de β las cromosómicas sería predominante. Para cefamandol y cefoxitina, la distribución es prácticamente monomodal en 4 concentraciones, sugiriendo una sola población y la resistencia elevada a la hidrólisis por las 2 β las cromosómicas caracterizadas en la especie (Figura 14). Respecto de los más novedosos ABL, la distri-

bución es más bimodal, con una población muy sensible y otra con cierta "sensibilidad disminuida" representada por valores de CMI en torno a 1 ug/ml (Figura 15). Que el nivel de producción de β-lactamas cromosómicas en esta 2ª población afecte a estos ABL, o que alteraciones de la permeabilidad celular sean más verosímiles está por demostrar.

Los fenotipos de resistencia en *Y. enterocolitica* difieren algo según que se articulen considerando criterios exclusivamente microbiológicos o farmacocinéticos (Tabla 33B). Atendiendo a estos últimos, sólo existe un fenotipo, resistente a ampicilina, carbenicilina y cefazolina y sensible al resto de ABL. Desde el punto de vista microbiológico, y considerando los PCSM para ampicilina, carbenicilina y cefazolina, y el PCRM para el resto, se diferenciaría un fenotipo sensible a todos los ABL con incidencia del 56,1%, que representaría la población más naturalmente sensible. Además, hemos diferenciado el fenotipo 2 coincidente con el clínico (17,4%); el fenotipo 3 (2,0%) con sensibilidad disminuida a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y moxalactam; y el fenotipo 4, similar al clínico, pero con cierta actividad de carbenicilina, sin duda resultado de su mayor resistencia a la hidrólisis por mecanismos de codificación cromosómica. A lo largo del intervalo de tiempo analizado, no hemos encontrado ninguna modificación sustantiva en la sensibilidad-resistencia de *Y. enterocolitica* a los ABL.

7. PROTEUS VULGARIS Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

P. vulgaris es un microorganismo con idiosincrasia específica que determina su singularidad. Desde la perspectiva clínica, *P. vulgaris* es un patógeno infrecuente, cuya participación en los procesos infecciosos suele estar enmascarada en las estadísticas hospitalarias bajo el epígrafe *Proteus* indol(+). En nuestro hospital, a lo largo de la última década *P. vulgaris*, se ha aislado en el 0,2-0,6% de las muestras clínicas bacteriológicamente positivas⁵⁸¹. Su presencia está asociada con mayor frecuencia a la infección urinaria relacionada con la cateterización y la cirugía urológica (0,68%), a otro tipo de infecciones quirúrgicas (0,63%) y a la bacteriemia (0,2%).

Su interrelación con los ABL también ratifica su singularidad. Los mecanismos bioquímicos de resistencia ABL y su codificación

genética son de tal naturaleza, que en buena medida, puede ser considerado como especie aislada o de transición entre los diferentes géneros que forman la familia **Enterobacteriaceae**.

La resistencia de bajo nivel ligada a la presencia de una sola porina esencial lo acerca a otras bacterias del género **Proteus** ¹¹⁰. La producción de βlas cromosómicas inducibles, denominadas cefuroximasas²⁶⁴ y más recientemente oxiimino cefalosporinasas inducibles²⁰⁶, y los fenómenos de inducción y selección de mutantes desreprimidos, lo aproximan a otros géneros, particularmente **Enterobacter**, **Citrobacter**, **Morganella** y **Serratia** ^{206, 256, 264, 276, 411, 485-488, 493, 582}. Su diferencia estriba en la propia naturaleza de estas βlas inhibidas por el ácido clavulánico, más eficaces y con un efecto paradójico frente a carbenicilina, que determinan cifras de resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y monobactams inferiores a las inferidas por las genuinas βlas inducibles. Por otra parte, el número de βlas plasmídicas distintas codificadas por **P. vulgaris** y su incidencia son, probablemente las más reducidas dentro de la familia **Enterobacteriaceae**^{203, 262, 583}. Además en **P. vulgaris** no se han identificado, por el momento, βlas de espectro expandido^{207, 277}.

En los 10 años comprendidos en nuestro trabajo hemos estudiado 338 aislados de **P. vulgaris**. Un porcentaje en torno al 4-7% se mostraban sensibles a concentraciones bajas de ampicilina. Sin duda, se trata de cepas que de forma natural presentan un bajo nivel de βla cromosómica, insuficiente para ocasionar niveles más altos de resistencia a todos los ABL, de forma análoga a los obtenidos en el laboratorio por mutagénesis⁵⁷⁷. Esta pequeña población sensible de pleno derecho sin duda diferente cuantitativamente de la mayoría resistente, hace posible la aplicación de un polinomio de 3º grado a la representación gráfica de la distribución, que tiene cierto carácter exponencial por el incremento progresivo de aislamientos al elevarse las CMIs (Figura 16). Existe una segunda población de resistencia intermedia (18%), entre 8 y 64 ug/ml, condicionada por la expresión "más normal" de la βla cromosómica inducible, y una tercera población, próxima al 80% de los aislados, debida en su mayor parte a la producción de cantidades elevadas de enzima.

La distribución respecto de cefazolina tiene un aspecto similar, consecuencia de una cinética enzimática no muy diferente a

la de ampicilina en términos de eficacia hidrolítica (Figura 16). Respecto de cefamandol, la situación difiere ligeramente, con un 10% de cepas más sensibles en relación con ampicilina y cefazolina, que seguramente obedece a una mayor resistencia a concentraciones intermedias de β la cromosómica inducible. Así se explican los fenotipos, 8 y 10, con resistencia disociada entre ampicilina-cefazolina y cefamandol (Tabla 38B).

En *P. vulgaris* la marcada actividad de cefoxitina y moxalactam, dos metoxi-cefalosporinas, representada por un rango estrecho de CMIs, hace que la distribución sea casi monomodal expresada mejor, matemáticamente, por un polinomio de 2º grado (Figuras 16 y 17). Sin duda es la consecuencia de la alta resistencia a las β las cromosómicas inducibles de *P. vulgaris*, y al fenómeno paradójico relacionado con la inducción a bajas concentraciones 206,264,269,411,487,584. Aunque la actividad intrínseca del moxalactam es mayor, en un estrecho margen de concentraciones, 2-8 para cefoxitina y 0,1-0,2 para moxalactam, se agrupan el 80% de los aislamientos. A resaltar la presencia del 3% y 1,6% de cepas, respectivamente, con cierto grado de resistencia probablemente motivado por fenómenos de permeabilidad de la ME, más acusados para estos ABL de mayor tamaño molecular¹¹⁰.

La elevada actividad de carbenicilina en *P. vulgaris* condiciona una distribución bimodal que se acomoda muy bien a un polinomio de 3º (Figura 16). Por otra parte, esta actividad determina la incidencia alta de fenotipos sensibles a carbenicilina (82% del total), e incluso la existencia de otros catalogados como resistentes por el valor del PCRM (32 ug/ml), que sólo difieren de los anteriores en la desrepresión enzimática ocasionada por la selección de mutantes hiperproductores de β la cromosómica inducible (Tabla 38B).

La distribución de aislamientos en el rango de CMIs permite diferenciar tres tipos de poblaciones reflejadas en los fenotipos de resistencia (Figura 16). Una primera población integrada por el 82% de los aislamientos es sensible a concentraciones inferiores a 32 ug/ml de carbenicilina. La producción baja o intermedia de niveles de β la cromosómica inducible es la responsable de este patrón de sensibilidad. Existe una segunda población, 6% de los aislamientos, con valores de CMI comprendidos entre 64 y 512 ug/ml. La hiperproducción cromosómica de β la inducible respondería de las cepas in-

cluidas en los límites bajos de este intervalo, mientras que las cepas con CMIs de 512 ug/ml, y la tercera población (8% del total) con CMIs superiores podrían codificar mecanismos plasmídicos⁵⁸³.

Respecto de cefotaxima y aztreonam, la distribución bimodal es muy parecida a la de carbenicilina, se ajusta bien a un polinomio de 3º grado que infiere PCRM inferiores a 0,5 ug/ml, y delimita 3 poblaciones diferentes (Figura 17). La primera y más extensa, 83% de los aislamientos, se enmarca entre concentraciones inferiores al PCSM. La segunda, 12-13% del total y delimitada por el intervalo entre los PCSM y PCRM, conforma una población de transición tal vez precursora de cepas con mayor nivel de resistencia. La última, formada por casi el 5% de las cepas, es una población con cierto grado de resistencia, debido a la síntesis de elevadas cantidades de β la cromosómica como consecuencia de la desrepresión⁵⁸¹.

Las β las implicadas en los diferentes fenotipos de resistencia de *P. vulgaris* son en síntesis de 2 tipos: β las cromosómicas inducibles, y en menor proporción β las plasmídicas clásicas. Sawai et al.²⁵⁶ describieron en 1968 la codificación por *P. vulgaris*, de una β la cromosómica inducible. Posteriormente, se han referido enzimas con propiedades enzimáticas comunes, denominadas β las 1c de Richmond y Sykes²¹¹, "cefuroximasas"²⁶⁴, "oxiiminocefalosporinasas inducibles"²⁰⁶ y β las del tipo 2e en la clasificación de Bush²⁷⁶ de 1989. Se trata de una familia homogénea de enzimas inducibles, aunque de pI variable que oscila entre 6.9 y 9.5, inhibidas por el ácido clavulánico, y con un perfil de sustrato que incluye la hidrólisis de cefotaxima y aztreonam pero no la de cefoxitina, ceftazidima, moxalactam e imipenem^{206, 256, 264, 276, 411, 485-488, 493, 582}.

Los fenómenos de inducción son similares a los protagonizados por las β las cromosómicas inducibles de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Serratia*, aunque con aspectos específicos relacionados con un "fenómeno paradójico" que inhibe el crecimiento a concentraciones bajas del inductor^{206, 264, 269, 411, 487, 584}. Además, se ha demostrado la presencia de mutantes hiperproductores de enzima, que una vez seleccionados ocasionan resistencia elevada a todos los A β l con excepción de los carbapenems^{584, 585}. Por otra parte, en *P. vulgaris* la responsabilidad de las β las plasmídicas es limitada. Sólomente se han caracte-

rizado TEM-1, TEM-2²⁰³, aunque como *Proteus* indol (+) también se han descrito SHV-1 y PSE-2²⁶². Su incidencia no parece superior al 10% de las cepas resistentes a ampicilina, y como en otras especies TEM-1 es prevalente⁵⁸³. Además en *P. vulgaris* no se han identificado, por el momento, β las de espectro expandido^{207,277}.

A la codificación de oximinocefalosporinasas inducibles, y a su diferente grado de producción, se deben los fenotipos sensibles a carbenicilina, 7 al 11, y alguno de los resistentes, particularmente los fenotipos 4, 5 y 6. El fenotipo más frecuente, fenotipo 9 con incidencia del 67,5% del total, se caracteriza por la resistencia a ampicilina, cefazolina y cefamandol y la sensibilidad al resto de ABL. La síntesis baja o intermedia de β la cromosómica sería la responsable de este fenotipo, así como de los fenotipos 7 (3,7%) y 8 (8,9%) que muestran cierto grado de sensibilidad a cefazolina y cefamandol⁵⁸¹. La hiperproducción enzimática desreprimida tras la selección de mutantes combinada con alteraciones de la permeabilidad, respondería del fenotipo 11 resistente a todos los ABL excepto carbenicilina^{269,581}.

En los fenotipos resistentes a carbenicilina, 2 al 6, pueden combinarse más mecanismos. El fenotipo 3, el más frecuente en este grupo (8,4%), caracterizado por CMIs de carbenicilina superiores a 512 ug/ml, parece evidente la presencia de β las plasmídicas, esencialmente TEM-1, que en la experiencia de Cullman⁵⁸³ alcanza una incidencia del 12%. El fenotipo 5 (2,8%) es genuino de la producción moderada-alta de oximinocefalosporinasas, con afectación de cefotaxima y aztreonam. En el fenotipo 6 (1,1%), con resistencia a todos los ABL, es muy verosímil el solapamiento de los tres mecanismos de resistencia demostrados en *P. vulgaris*: permeabilidad que afectaría a cefoxitina y moxalactam; β las plasmídicas que interesarían a carbenicilina; e hiperproducción de oximinocefalosporinasas que atañerían más específicamente a cefalosporinas de 3ª generación.

8. ENTEROBACTER SPP. Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

Enterobacter lidera un grupo de microorganismos en el que se alinean *Citrobacter*, *Morganella*, *Serratia* y *Pseudomonas*, considerados la verdadera "piedra de toque" de los ABL. Desde una

perspectiva microbiológica estas bacterias gram-negativas han encumbrado un mecanismo de resistencia, la síntesis de β las cromosómicas inducibles (β CRI)^{206,386}, y han originado un interesante polémica sobre el mecanismo de inactivación del antimicrobiano⁴³⁹. Desde un prisma más clínico, estos microorganismos constituyen "el mayor núcleo" de resistencia "in vivo" y fracaso terapéutico a los nuevos ABL desarrollados en la década de los 80. La síntesis de β CRI por *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*, su perfil cefalosporinasa y la inactivación mayor de cefalotina y cefaloridina respecto de ampicilina, son conocidas desde los primeros estudios sobre β las^{211,255-257}. El aislamiento de cepas resistentes a los nuevos ABL se produce en los estudios "in vitro" iniciales⁵⁸⁶, mientras que el importante papel de estas β CRI en la resistencia se documenta fehacientemente a partir de 1980^{115,386,435}.

La mayor parte de las cepas de *Enterobacter* sintetizan, aún con expresión de bajo nivel, una o varias β CRI con pIs que varían entre 7.6 y 8.8^{209,275,266,410,412,414,416,422,423,427,428,450,455}. Esta síntesis es susceptible de incrementarse por mecanismos de inducción con substratos betalactámicos y no betalactámicos, o por fenómenos de mutación genética. La inducción enzimática es un fenómeno reversible, que determina concentraciones transitorias y elevadas de β la tras la exposición del microorganismo a un inductor, generalmente un ABL^{206,217,264,266,267,386,390,410-421}. Aunque el mecanismo molecular responsable de la inducción no se conoce con exactitud, estudios genéticos recientes indican que al menos 4 genes, *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*, están involucrados^{265,422-424}.

La desrepresión estable por mutación genética es de mayor repercusión clínica por las posibilidades de selección de mutantes resistentes^{267,425-432}. Ocurre de manera espontánea a una tasa de 10^{-6} - 10^{-8} y da lugar a niveles constitutivos muy elevados de enzima^{209,266,267,410,421,427,430-435}. Ambos fenómenos tienen lugar en la misma población de forma que esta, capaz de ser inducida transitoriamente, alberga mutantes con producción desreprimida, elevada y estable del enzima. Después, y como consecuencia del tratamiento con ABL estos mutantes se hacen dominantes mediante un fenómeno de selección "in vivo". Así se llega a la resistencia clínica a múltiples ABL y al fracaso terapéutico en el 10-50% de los pacientes infectados con estas especies^{266,270,271,393-396}.

La respuesta de **Enterobacter** a los ABL está condicionada por la resistencia natural de cada antibiótico a las BCRI y por el nivel de producción enzimática. En otras palabras, depende de la composición y homogeneidad de la población bacteriana. En cepas con población mayoritaria susceptible de inducción y en ausencia de inductores, la respuesta será buena para aquellos ABL con resistencia natural a niveles bajos de BCRI: carbenicilina, cefamandol, cefalosporinas de 3ª generación, monobactams y carbapenems^{268,269}. En cepas con alto índice de mutantes la respuesta será deficiente, excepto para carbapenems, con incrementos de CMI de 4-16 veces para carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina y piperacilina y 64-256 veces para aztreonam y las cefalosporinas de 3ª generación, respecto de los aislamientos con producción normal de BCRI^{268,269}.

Los resultados de nuestro estudio de sensibilidad a ABL con 1.617 aislamientos de **Enterobacter spp.**, en su mayoría (78%) **E. cloacae**, y su distribución respecto de distintos ABL (Figuras 18 y 19), nos permiten diferenciar tres poblaciones: la primera correspondería a un nivel basal de producción de BCRI con sensibilidad moderada o bajo índice de resistencia a ampicilina; en la segunda la resistencia a ampicilina, cefazolina y cefoxitina, y la sensibilidad a cefamandol y cefalosporinas de 3ª generación, sugiere un grado intermedio de producción de BCRI y la presencia concomitante de mecanismos plasmídicos en el 15% de los aislamientos. La tercera población, resistente a cefotaxima, ceftazidima, moxalactam y aztreonam, insinúa la presencia de cepas con producción elevada y establemente desreprimida de BCRI.

En **Enterobacter**, la actividad de la carbenicilina es un excelente testigo para la diferenciación de las tres poblaciones. La distribución bimodal respecto de un amplio intervalo de CMIs, adecuada matemáticamente a un polinomio de 3º grado, hace patente tal diferenciación. Una población mayoritaria (76,9%) es sensible a concentraciones inferiores a 64 ug/ml de carbenicilina. En ella se distinguen dos subpoblaciones: una con un nivel bajo de producción de BCRI que se inhibe por concentraciones entre 1 y 8 ug/ml; y una segunda subpoblación con nivel enzimático intermedio caracterizada por CMIs entre 8 y 64 ug/ml. La población resistente a carbenicilina (23,1%) precisa CMIs superiores a 64 ug/ml, y en ella podrían yuxtaponerse dos

mecanismos de resistencia: hiperproducción de BCRI y síntesis de βlas plasmídicas. La aplicación de una ecuación de 3º grado facilita el hallazgo de los PCSM (8 ug/ml) y PCRM (64 ug/ml), que se correlacionan muy bien con las abscisas máxima, de inflexión y del 95%.

La distribución respecto de ampicilina es peculiar, y dentro de cierto carácter exponencial, es posible advertir una disposición bimodal con las tres poblaciones bien diferenciadas. La primera delimitada por una CMI de 64 ug/ml engloba al 47,5% del total y en ella se distinguen dos subpoblaciones: la primera (28,1% del total) sería la población naturalmente sensible a ampicilina y en ella la síntesis de BCRI debería ser de bajo nivel; la segunda (19,4% del total), ya implicaría un nivel de producción enzimática más elevado como corresponde a concentraciones que oscilan entre 32 y 64 ug/ml. La última población, 52,5% de todos los aislados de **Enterobacter**, requiere para su inhibición CMIs superiores a 64 ug/ml, y en ella, y mas concretamente en aquella fracción con CMIs superiores a 256 ug/ml, el solapamiento de mecanismos cromosómicos y plasmídicos es más factible.

Los resultados respecto de cefazolina y cefamandol confirman su labilidad a la inactivación por las BCRI de **Enterobacter**^{267, 268}. No obstante, se diferencia una población sensible (10%-8%) que debe responder a la producción muy baja de BCRI. Para el resto de los aislamientos, la distribución adquiere un desarrollo exponencial con más del 80% de la población resistente a concentraciones de 32 ug/ml. La distribución en relación con el cefamandol es superponible a la de carbenicilina, con un 76,4% de las cepas sensibles a 8 ug/ml. Además, se dibujan otras dos poblaciones en las que la participación de mecanismos cromosómicos desreprimidos y plasmídicos de diferente nivel, es más difícil de segregar.

En nuestra experiencia, entre 12% y 15% de las cepas de **Enterobacter** tienen valores de CMI para cefotaxima, ceftazidima, moxalactam y aztreonam, superiores a 2 ug/ml, considerado por nosotros como PCRM. Esta incidencia de resistencia, que se ha incrementado discretamente en nuestro hospital hasta cifras próximas al 20% a partir de 1990, es inferior al 19% obtenido en EE.UU entre 1983 y 1988⁵³⁰, al 20-25% obtenido recientemente en

Francia⁵³², y al 30-40% referente a Bélgica⁵⁵³ y Holanda⁵⁵⁴. Sin duda, la procedencia de UCIs de las cepas de las series francesa, belga y holandesa, tiene una influencia negativa en los altos índices de resistencia. Respecto de estos ABL, la distribución de nuestros aislados en un amplio rango de CMIs tiene un carácter bimodal, bien representado por un polinomio de 3º grado, y facilita la distinción de 3 poblaciones (Figura 19): la primera, 73% de incidencia, muestra CMIs inferiores a los PCSM (0,1-0,2 ug/ml) y corresponde a la población sensible de pleno derecho; la segunda, 15% de incidencia, está delimitada por CMIs entre los PCSM y PCRM, y da lugar a una población intermedia a expensas de la cual sería más factible acceder a grados más altos de resistencia como los alcanzados por la tercera población; esta última, 12%-15% en función de los distintos ABL, está caracterizada por CMIs superiores a 2 ug/ml, que en el 0,5%-3% de los aislamientos superan los 64 ug/ml. Sin duda, se trata de cepas seleccionadas por el tratamiento con estos antimicrobianos en las que la síntesis de BCRI alcanza su máxima expresión^{267,268}.

La diferenciación de 3 amplios grupos de fenotipos de resistencia en **Enterobacter** es posible en función de la actividad de ampicilina y carbenicilina (Tabla 43B). En el primero se enmarcan los fenotipos 1 y 2, caracterizados por la presencia de concentraciones bajas o moderadas de BCRI y cierto grado de sensibilidad a la ampicilina. Incluirían el 38,9% de los aislamientos, aunque sólo 28,1% integraría la población natural sensible a ampicilina e inhibida por CMIs inferiores al PCSM (16 ug/ml).

Al segundo grupo, fenotipos 3 al 7, pertenecen el 23,1% de las cepas, todas resistentes a carbenicilina. Los fenotipos 5 y 6, con sensibilidad divergente al cefamandol y uniforme a las cefalosporinas de 3ª generación, deben representar a las cepas con mecanismos plasmídicos de resistencia y su incidencia (17,7%) es inferior a la referida en otras series^{538,539}. En **Enterobacter** está reconocida la codificación de 6 βlas plasmídicas clásicas de las que TEM-1 es prevalente, excepto en alguna zona de los EE.UU donde OHIO-1 se identifica con mayor asiduidad^{203-209,216,261,262,275,309,324}. El último fenotipo de este grupo, fenotipo 7 con incidencia del 4,4%, está caracterizado por la resistencia a todos los ABL ensayados. Parece verosímil que la

hiperproducción de BCRI sea la responsable de tal patrón, aunque la afectación de la carbenicilina, incluso con valores de CMI superiores a 1024 ug/ml, podría sugerir la concomitancia de mecanismos plasmídicos clásicos o nuevos. A este respecto, está referida en la literatura la producción de TEM-3^{207,277}, y en nuestra experiencia hemos identificado en *E. cloacae* y *E. gergoviae* dos nuevas BPEA de pI 5.9 y 7.6.

El tercer grupo amplio de fenotipos en *Enterobacter* viene definido por la resistencia a ampicilina y la sensibilidad a carbenicilina que excluye la posibilidad de Blas plasmídicas. Su incidencia del 38% podría ser mayor, 69,2%, si incluyéramos en él el fenotipo 2 (31,2%) con un grado moderado de resistencia a ampicilina. La producción progresivamente incrementada de BCRI debe ser responsable de la diferenciación de tres fenotipos. El fenotipo 8, el más común en *Enterobacter*, posee el patrón de sensibilidad típico de este microorganismo cuando la producción de BCRI tiene "el nivel normal". Concentraciones más elevadas de Bla deben dar lugar al fenotipo 9, 4,4% de incidencia, resistente al cefamandol y sensible a las cefalosporinas de 3ª generación. En el último fenotipo, fenotipo 10, la hiperproducción desreprimida de BCRI origina un patrón cada día más habitual, caracterizado por la resistencia a cefotaxima, ceftazidima, moxalactam, y aztreonam, y la sensibilidad moderada a carbenicilina con CMIs siempre por debajo de 64 ug/ml. Como en el fenotipo 7, no podríamos descartar la conjunción en estas cepas de alteraciones en la permeabilidad que potenciarían el mecanismo enzimático^{122-124,142,144,145}.

9. CITROBACTER FREUNDII Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

El substrato que define la interrelación de *C. freundii* con los ABL es equiparable al referido para *Enterobacter*, al ser muy coincidentes los mecanismos de resistencia involucrados. La codificación de BCRI en *C. freundii* y su regulación y control, guardan enorme paralelismo respecto de *Enterobacter* 206,209, 211,256,263,275,441,456,457,469-471. De análoga manera, en *C. freundii* se ha descrito el desarrollo de resistencia "in vivo" a expensas de la selección de mutantes con producción desreprimida de BCRI^{268,269,395,426,430}. Además, en *C. freundii* está documentada la producción de 6 Blas plasmídicas clásicas entre

las que predomina TEM-1203, 209, 216, 262, 275, 309, 324, y alguna β PEA, esencialmente TEM-3 y TEM-7207, 277.

En nuestra experiencia que alcanza a 469 aislamientos de *C. freundii* tal paralelismo con *Enterobacter* es un hecho. Sin embargo, se observan algunos matices diferenciales, fundamentalmente en relación con ampicilina, cefazolina y cefoxitina, y con una mayor resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, que confieren a esta especie cierta singularidad.

La distribución de aislamientos respecto de ampicilina es mucho más bimodal con dos poblaciones diferenciadas a expensas de una CMI de 64 ug/ml, que constituyen 48,8% y 51,2% respectivamente (Figura 20). En la primera es posible distinguir dos subpoblaciones: una entre 0,5 y 16 ug/ml, 24,7% del total, integraría la población natural de *C. freundii* sensible de pleno derecho a ampicilina; otra delimitada entre 16 y 64 ug/ml, 24,1% del total, muestra mayor resistencia a ampicilina. Los diferentes niveles de producción de β CRI, bajo y moderado o intermedio, determinarían la diferenciación. Además, existe una población claramente resistente con un acúmulo de cepas con CMIs superiores a 256 ug/ml que denotan una posible mayor participación de los mecanismos plasmídicos en esta especie.

La inestabilidad de cefazolina a las β CRI se pone de relieve por la curva exponencial que representa la distribución. El análisis matemático determina PCSM y PCRM superiores a 256 ug/ml, que descartan su estimación en el análisis de fenotipos. Respecto de cefoxitina, la distribución también es algo distinta de la observada en *Enterobacter*, delimitándose con mayor nitidez la presencia de una población sensible a 8 ug/ml (13,9%), una población intermedia entre 16 y 64 ug/ml (14,7%), y una amplia población resistente (71,4%) con CMIS superiores a 64 ug/ml que delatan la labilidad de cefoxitina a las β CRI de *Citrobacter*.

Como en *Enterobacter*, la actividad de cefamandol en *C. freundii* es elevada con 76,1% de los aislamientos sensibles a 8 ug/ml. Este grado de sensibilidad y el valor modal de 1 ug/ml denotan la eficacia de cefamandol en la competencia con las β CRI de *C. freundii*. En la población resistente, 23,9% restante, parece factible la simbiosis entre mecanismos de resistencia cro-

mosómicos y plasmídicos. En relación con las cefalosporinas de 3ª generación, de nuevo debemos remitirnos a la situación descrita en *Enterobacter*, aunque con un índice discretamente superior de cepas resistentes a 2 ug/ml que es tomado como PCRM. Esta prevalencia que en nuestra serie oscila entre 13% y 17%, es ligeramente inferior a la recientemente descrita en EE.UU 530, Francia⁵³² y Holanda⁵⁵⁵, y está muy lejos del 50% obtenido en Bélgica en cepas aisladas de pacientes ingresados en UCIs 554. El análisis de los resultados a lo largo de los 10 años de nuestro estudio revela cierta estabilidad en la incidencia de cepas resistentes, aunque en el año 1984 y de forma esporádica su incidencia se elevó hasta el 20% de los aislamientos.

También la diferenciación de fenotipos en *C. freundii* sigue un esquema similar al referido en *Enterobacter* (Tabla 48B). Los fenotipos resistentes a carbenicilina, 3 al 6, tienen una incidencia discretamente superior (30,9%) que debe corresponderse con un número mayor de cepas productoras de plasmídicas. Como en *Enterobacter*, el antibiograma más habitual en *Citrobacter*, integrado por la suma de los fenotipos 2 y 7, muestra un patrón representado por la resistencia moderada o elevada a ampicilina, y la sensibilidad a carbenicilina, cefamandol y cefalosporinas de 3ª generación, y se debe corresponder con la síntesis moderada de β CRI. En sentido opuesto, los fenotipos 6 y 9, caracterizados por la resistencia a cefotaxima, ceftazidima, aztreonam y moxalactam son más frecuentes en *Citrobacter*, denotando una mayor profusión de cepas con síntesis desreprimida de β CRI. Este hecho sugiere que los mecanismos de selección de mutantes desreprimidos podrían ser más eficaces en *C. freundii*.

10. MORGANELLA MORGANII Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

M. morganii es un microorganismo genotípicamente próximo a *Enterobacter* y *Citrobacter*, mientras que la expresión fenotípica de la resistencia a ABL lo acerca más a *P. vulgaris*. Con los primeros comparte mecanismos de resistencia esenciales, ligados a la producción de β CRI; con el segundo comparte mecanismos de bajo nivel asociados a alteraciones en la permeabilidad y un antibiograma bastante superponible.

La resistencia de *M. morganii* a los ABL está mediada, fundamen-

talmente, por la codificación de β CRI^{206,211,266,267,275,451,461}. Se trata de enzimas con pI entre 7.7 y 8.7, con un perfil típico de cefalosporinasas y una tasa de hidrólisis moderada para ampicilina y baja para carbenicilina, cefoxitina y cefalosporinas de la 3ª generación. La regulación y el control de la expresión guarda paralelismo con el de las β CRI de **Enterobacter** y **Citrobacter**²⁶³, sin embargo el nivel de producción de enzima es inferior en mutantes desreprimidas por lo que la contribución a la resistencia parece menos relevante^{268,269,584}. En consecuencia, la incidencia de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación es inferior a la descrita para **Enterobacter** y **Citrobacter**, como también lo son las referencias relativas al desarrollo de resistencia clínica por selección de cepas desreprimidas hiperproductoras de β CRI^{266,270,587,584}.

En síntesis, la tasa de mutantes desreprimidas en **Morganella** podría ser inferior; su nivel de producción enzimática parece más bajo; y los valores de CMI para las cefalosporinas de 3ª generación también son de menor cuantía. Respecto de **P. vulgaris** la coincidencia en el patrón de sensibilidad radica en la actividad de carbenicilina y sobre todo de cefoxitina, en el que se distancia de **Enterobacter** y **Citrobacter**. Por otra parte, la actividad del ácido clavulánico frente a las β las de **P. vulgaris** está en contraposición con la ausencia de poder inhibitorio frente a las β CRI de **Morganella**, **Enterobacter** y **Citrobacter**.

De nuestros resultados obtenidos con 693 aislamientos de **M. morganii** se infiere una distribución en 3 poblaciones, correspondientes a niveles bajos, intermedios y elevados de β CRI, equiparable a la observada en **Enterobacter** y **Citrobacter**. Además, en algunos fenotipos caracterizados por la resistencia común a ampicilina, carbenicilina, y en cierto grado cefamandol, es muy verosímil la codificación adicional de β las plasmídicas, esencialmente TEM-1 como enzima predominante sobre SHV-1, OXA-1, PSE-2 y OHIO-1, también identificadas en **Morganella** ^{203,209,216,261,262,309,324}.

La distribución de los aislamientos respecto de ampicilina y carbenicilina es bimodal, aunque muy diferente la incidencia de cepas en las poblaciones sensible y resistente respecto de cada una (Figura 22). La actividad antimicrobiana de la ampicilina

en *M. morganii* esquematiza tres poblaciones. La primera (6,5%) se inhibe por concentraciones inferiores a 16 ug/ml, y en ella la producción de β la sería de bajo nivel equivalente a la obtenida con cepas clínicas tras la acción de agentes mutágenos^{269, 584}. La segunda población (77,5%), delimitada por CMIs entre 32 y 256 ug/ml, la integrarían las cepas con nivel de β la intermedio que originan una acumulación modal en 32-64 ug/ml (61,6%). La tercera población (15,95%), con CMIs superiores a 256 ug/ml, estaría formada por los aislamientos con hiperproducción enzimática establemente desreprimida, en posible concomitancia con la síntesis de β las plasmídicas. La aplicación matemática de un polinomio de 3º grado delimita un PCSM de 32 ug/ml, por debajo del cuál estaría la población sensible. Las características de la carbenicilina, poco inductora de las β CRI de *M. morganii* y estable a su hidrólisis^{269, 584}, determinan una población sensible amplia (78,5%) y otra población resistente con CMIs superiores a 16 ug/ml (PCRM), integrada por cepas en las que la participación de TEM-1 es más factible.

El antibiotipo habitual de *M. morganii* se caracteriza por la resistencia a las cefalosporinas de 1ª generación, y la sensibilidad a cefamandol y cefoxitina. La distribución respecto de cefamandol ratifica la existencia de dos amplias poblaciones separadas, un poco artificialmente por el PCSM (2 ug/ml), que incluyen en conjunto más del 90% de los aislamientos. Así, se pone de manifiesto la resistencia de cefamandol a la inactivación por las β las habituales de *M. morganii*.

La actividad de cefoxitina en *Morganella* constituye el hecho diferencial más notorio respecto de *Enterobacter* y *Citrobacter*. Cefoxitina es un potente inductor de β CRI pero relativamente lábil a su inactivación, mostrando una actividad similar en cepas con niveles distintos de producción de β CRI, traducida por CMIs entre 4 y 16 ug/ml^{268, 269, 584}. En nuestra experiencia, solamente el 2% de las cepas precisaban CMIs superiores a 32 ug/ml considerado como PCRM, y en ellas es muy factible la existencia de alteraciones en la permeabilidad ligadas a la presencia de un sólo porina¹¹⁰.

Las cefalosporinas de 3ª generación y los monobactams son poco inductores de las β CRI de *M. morganii*, y más estables a la inactivación que las enzimas de *Enterobacter* y *Citrobacter*, co-

mo revela su excelente actividad frente a cepas con niveles de producción basal e inducible y los valores de CMI intermedios en cepas establemente desreprimidas^{269,584}. Además, en *Morganella* apenas se han caracterizado SPEA otras que TEM-13²⁷⁷. La distribución de aislamientos respecto de cefotaxima, ceftazidima, moxalactam y aztreonam también tiene carácter bimodal, diferenciándose una extensa población muy sensible (80%); una segunda moderadamente menos sensible (11%) con CMIs entre los PCSM (0,06-01 ug/ml) y los PCRM (0,2-1 ug/ml); y una última población resistente (9%) en la que la mayor parte de las cepas muestran CMIs entre 2 y 8 ug/ml, inferiores a sus homónimas de *Enterobacter* y *Citrobacter*. Este índice de resistencia está en armonía con los publicados en otras series en EE.UU y Europa 530,532,553,554.

En *M. morganii* los fenotipos habituales se caracterizan por la sensibilidad a carbenicilina, poniendo de relieve la infrecuencia de β las plasmídicas en esta especie, y un número de aislamientos más bien bajo de cepas con producción desreprimida de BCRI. El fenotipo 6, con resistencia a ampicilina y cefalosporinas de 1ª generación, es el más frecuente en *Morganella* (58,8%), evidenciando la dominancia de una población con una tasa moderada de producción de BCRI. Los fenotipos 4, 5, y 9 incluyen cepas con cierto grado de resistencia a la cefalosporinas de 3ª generación, motivada por una población hiperproductora de BCRI.

Sorprendentemente, los fenotipos 4 y 8 muestran resistencia disociada entre cefotaxima, ceftazidima y aztreonam por un lado, y cefoxitina y moxalactam. Este hecho reconocido por otros autores, no es fácil de justificar por los mecanismos de resistencia habituales en *Morganella*⁵⁸⁴. Aventurar una hipótesis sobre alteraciones selectivas en la permeabilidad parece arriesgado, cuando las metoxicefalosporinas, por su mayor tamaño molecular, deberían acceder peor al interior de la célula. La existencia de esta disociación en cepas sensibles y resistentes a carbenicilina, aboga más por un mecanismo enzimático probablemente asociado a mayor sensibilidad en las PBPs a estos ABL.

Las cepas con patrón de resistencia que incluye CMIs elevadas de carbenicilina se aíslan menos frecuentemente y los dos más comunes, fenotipos 2 y 3 (17,1%) revelan la codificación de me-

canismos de resistencia plasmídicos, TEM-1 con elevada probabilidad^{262,309,324}.

11. SERRATIA MARCESCENS Y ANTIBIOTICO BETALACTAMICOS.

S. marcescens es un microorganismo genuinamente protagonista de la infección nosocomial, que a lo largo de la era antimicrobiana ha adquirido múltiples marcadores de resistencia a los antibióticos que añadir a su patrón de resistencia natural a ampicilina, cefalosporinas de la 1ª generación, tetraciclinas, polimixina B y colistina⁵⁸⁹. Su antibiotipo actual, ciertamente homogéneo en relación con los ABL, muestra unas características en las que no es sencillo discernir entre los diferentes mecanismos de resistencia, dada la frecuencia en que participan dispositivos enzimáticos cromosómicos y plasmídicos, y alteraciones en la permeabilidad de la ME, mucho más comunes que en otras *Enterobacteriaceae*.

En *S. marcescens* está bien documentada la responsabilidad de las BCRI en la resistencia "in vitro", así como en el desarrollo de resistencia "in vivo" y en el fracaso terapéutico^{206,209,263-269,275,414,458-460}. Además, se han caracterizado enzimas cromosómicas de tipo metaloenzima activas frente a carbapenems³⁶⁴, y un número reducido de Blas plasmídicas: TEM-1, TEM-2, OXA-2 y OHIO-1, con marcada preponderancia de TEM-1 como en la mayoría de *Enterobacteriaceae*^{203,216,262,309,324}. Por otra parte, la permeación de ABL a través de la ME parece más dificultosa que en otros gram-negativos con excepción de *Pseudomonas*, y la influencia de un efecto sinérgico entre la barrera de permeabilidad y la producción de Blas determina menor eficacia para las cefamicinas y las cefalosporinas de espectro ampliado. No es, por tanto inusual, la resistencia cruzada con antibióticos con otra estructura química: aminoglicósidos, cotrimoxazol y quinolonas, ni la aparición de resistencia amplia durante el tratamiento combinado con diferentes antimicrobianos^{104-106,125-127,144,145,270}.

La resistencia natural de *S. marcescens* a ampicilina, cefazolina, e incluso cefamandol se hace patente en nuestros 2.290 aislados por la curva exponencial que representa su distribución (Figura 24). La interpretación matemática de esa distribución

determina puntos críticos por encima de 256 ug/ml, que impiden la discriminación de poblaciones y la diferenciación de fenotipos. No obstante, el nivel gradual de producción de β CRI, que sin duda se da en esta especie, permite apreciar una fracción de aislados moderadamente resistentes o más sensibles a ampicilina y cefamandol, 13,4% y 19,7% respectivamente hasta una CMI de 32 ug/ml.

Las constantes cinéticas que definen la relación entre la carbenicilina y las β CRI de *S. marcescens* ocasionan una baja tasa de hidrólisis del antibiótico^{268,269}, y hacen posible, sin excluir la simbiosis con otros mecanismos de resistencia, la diferenciación nítida de 3 poblaciones (Figura 24). En la primera, 41,9% de los aislamientos inhibidos por CMIs entre 4 y 64 ug/ml (PCRM), la producción de β CRI parece de nivel bajo o moderado. En la segunda, solo 4% del total, podrían solaparse mecanismos enzimáticos de mayor expresión con disminución de la permeabilidad por modificaciones mutacionales en las porinas. En la tercera población, con resistencia franca a carbenicilina y CMIs mayores de 256 ug/ml, la yuxtaposición de mecanismos parece evidente y la participación de β las plasmídicas sería mucho más definitiva, sobre todo en el 39,6% de los aislados con CMIs superiores a 1024 ug/ml. El trazado de la curva se adecúa a una ecuación de 3º grado, a expensas de la cual los PCSM y PCRM se ajustan perfectamente a la moda y a las abscisas máxima de inflexión y del 95%.

Cefoxitina y *Serratia* forman un binomio controvertido en el que la limitada eficacia hidrolítica de las β CRI no se corresponde con la actividad moderada del antibiótico frente a más del 50% de los aislamientos. Sin duda, en cefoxitina adquieren mayor protagonismo el tamaño molecular y las peculiaridades de las porinas del microorganismo. Cefoxitina es un inductor potente de las β CRI de *Serratia*, aunque también es bastante estable a su inactivación como lo demuestran las CMIs uniformes, entre 4 y 16 ug/ml, que inhiben tanto las cepas con producción normal como las mutantes establemente desreprimidas^{268,269}. Conocida también su estabilidad a la mayoría de las β las plasmídicas, exceptuando las infrecuentes cefamicinasas²⁷⁷, el efecto sinérgico entre las β CRI y la permeabilidad reducida debe ser de la suficiente entidad para motivar una eficacia moderada del antimicrobiano. En nuestra serie, 80,1% de los aislamientos se in-

hiben por concentraciones inferiores a 64 ug/ml con un valor modal de 16 ug/ml considerado como PCSM. Estas cepas reflejan la estabilidad de cefoxitina a las BCRI de *S. marcescens* y su discreta actividad intrínseca. En el 16,9% restante de aislados parece más verosímil la participación de mecanismos relacionados con alteraciones de la permeabilidad.

Las cefalosporinas de 3ª generación y el aztreonam son considerados inductores débiles y lábiles respecto de las BCRI de *Serratia* ^{268, 269}. Así, en cepas clínicas con bajo nivel de producción enzimática las CMIs oscilan entre 0,1 y 0,5 ug/ml. No obstante, en cepas establemente desreprimidas las CMIs se elevan hasta 4-8 ug/ml para cefotaxima y 0,5-1 ug/ml para ceftazidima, poniendo de relieve la mejor permeación de los compuestos dianiónicos. Estos valores son concordantes con los PCRM obtenidos por nosotros como resultado de la aplicación de un polinomio de 3º grado a la distribución bimodal (Figura 25).

Como en cefoxitina, se diferencian 3 poblaciones aunque distribuidas de distinta manera. La población plenamente sensible oscilaría entre 75,2% de los aislados para ceftazidima y 51,4 % para cefotaxima que así evidencia su menor actividad intrínseca. Una población intermedia delimitada por los PCSM y PCRM fluctúa entre 43,2% para cefotaxima y 22,3% para ceftazidima. No parece arriesgado afirmar que estas cepas, en el tiempo, han podido "ser precursoras" de la tercera población, más resistente, que alcanza una incidencia a lo largo de los 10 años del estudio en torno al 5%.

Los datos obtenidos a expensas del coeficiente de correlación de la evolución de la sensibilidad así lo indican para cefotaxima, aunque no se aprecia una evolución similar para ceftazidima, aztreonam y moxalactam. Por otra parte, las cifras de incidencia de resistencia a cefotaxima de nuestra serie, 5,4% del total a 8 ug/ml, son mucho más bajas que las obtenidas en EE. UU⁵³⁰ (13%), Francia⁵³² (30%), Bélgica⁵⁵³ (27%) y Holanda⁵⁵⁴ (27%). También conviene reseñar que la procedencia de nuestros aislados de las diversas áreas del hospital, está en contraposición con los incluidos en las series europeas que proceden de UCIs, donde es más frecuente el empleo masivo de nuevos ABL que facilitarían la selección de los mutantes más resistentes.

En *S. marcescens* la actividad de la carbenicilina separa dos grupos de fenotipos (Tabla 58B). En el primero, 41,9% de incidencia global y sensible a carbenicilina, predomina el fenotipo 1 también sensible a cefoxitina, cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. La actividad de carbenicilina excluiría la codificación de β las plasmídicas en estas cepas, siendo más factible la producción de un nivel bajo o moderado de β CRI. En los fenotipos 2 y 3 no deben excluirse otros mecanismos adicionales ligados a la permeabilidad.

En el segundo grupo de fenotipos, 4 al 7, la resistencia a concentraciones elevadas de carbenicilina indica la frecuente participación de mecanismos plasmídicos. Esta circunstancia parece más evidente en el fenotipo 5 (51,3%) caracterizado por la sensibilidad a cefoxitina, cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. Por el contrario, en los fenotipos 6 (4,0%) y 7 (2,4%) el perfil de sensibilidad sugiere la combinación de mecanismos hidrolíticos cromosómicos y plasmídicos, sin excluir las variaciones en la permeabilidad que, sin duda, responden de la diferenciación de ambos fenotipos respecto de la actividad de cef-tazidima.

12. PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

P. aeruginosa es el patógeno nosocomial por excelencia y además un microorganismo oportunista causante habitual de infecciones graves en pacientes quemados, en pacientes con fibrosis quística, y en pacientes inmunodeprimidos o sometidos a transplante de órganos⁵⁹⁰. Sus características estructurales y fisiológicas le confieren una marcada resistencia intrínseca a las más diversas familias de antimicrobianos⁵⁹¹. En relación con los ABL, *P. aeruginosa* es el microorganismo con más mecanismos de resistencia bien caracterizados que atañen a modificaciones en sus PBPs^{165, 169, 186, 188, 194, 195}; disminución de la permeabilidad por alteraciones en las porinas^{104, 105, 128, 130-135, 138, 146, 151, 153}; y esencialmente producción de β las cromosómicas^{206, 211, 266, 267, 275, 329, 425, 432, 436, 464, 475, 477, 592, 593, 594} y plasmídicas^{203, 209, 211, 216, 261, 262, 275, 282, 295, 297, 299, 303, 304, 307, 308, 310, 322, 323, 326, 327, 329, 419, 475, 592, 593, 594}.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* codifican una BCRI, conocida como *Bla* de Sabath y Abraham⁴⁷⁷, con un nivel bajo de expresión que habitualmente no confiere en su estado basal resistencia a ABL. No obstante, un grupo numeroso de ABL, aminopenicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, son resistentes intrínsecamente merced a su elevada capacidad inductiva y a su tasa de hidrólisis cuando se incrementa ligeramente la producción de enzima. El control de la expresión enzimática se efectúa de una manera similar al modo reseñado para las *Enterobacteriaceae* con BCRI, aunque en *P. aeruginosa* parecen existir dos niveles de expresión antes de alcanzarse la desrepresión plena^{424,425}. De esta forma se ha documentado no sólo la resistencia "in vitro" ^{267,425,437,480,593}, sino también el desarrollo de resistencia "in vivo" en el curso del tratamiento con ABL^{115,132,195,270,387,393,481,482,501,505,507,508,587}.

En las cepas clínicas de *P. aeruginosa* se ha demostrado la presencia natural de mutantes desreprimidos, con una frecuencia que oscila entre 10^{-5} y 10^{-10} , que hiperproducen constitutivamente el enzima, originando resistencia a todos los ABL con excepción de los carbapenems^{268,269,437}. Las cefalosporinas de 3ª generación y los antibióticos monobactámicos son débiles inductores pero buenos sustratos del enzima, de manera que la selección de mutantes hiperproductores es un hecho factible en el curso del tratamiento²⁶⁹. Afortunadamente, la incidencia de cepas establemente desreprimidas no es superior al 10% entre los aislamientos clínicos^{323,329}, y ello explica la eficacia de ceftazidima y aztreonam en la práctica clínica. No obstante, la posibilidad de selección de mutantes con estas características es una realidad no desdeñable en tratamientos prolongados con estos ABL.

En *P. aeruginosa* se ha identificado 16 *Bla*s plasmídicas clásicas que confieren resistencia elevada a las carboxi y ureido penicilinas^{216,475,68,594} y una BPEA con un patrón de resistencia múltiple que incluye imipenem y meropenem³⁴⁴. Sin embargo, es sorprendente que a pesar de ser el microorganismo con más *Bla*s plasmídicas diferentes caracterizadas, la incidencia de cepas clínicas con *Bla*s plasmídicas no supere el 15%⁵⁹². En general, PSE-1 es la *Bla* plasmídica más prevalente entre los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* ^{216,592}, lo que está en contraposición con su limitada transferibilidad^{216,592}. El res-

to de *Blas* plasmídicas se han identificado con menor asiduidad, aunque OXA-2, OXA-1 y TEM-1 se han encontrado en el 13%, 9% y 8% de las cepas clínicas resistentes a carbenicilina, respectivamente^{216,592}. En nuestro país, en la serie publicada por Tirado et al.³²⁷, PSE-1 también es prevalente (49%), aunque TEM-1 se encuentra con una frecuencia mayor (38%) que en otras series referidas en la literatura. El patrón de resistencia conferido por estas enzimas está bien establecido, y constreñido esencialmente a las penicilinas semisintéticas y a la cefoperazona. Las cefalosporinas de 3ª generación, monobactams y carbapenems no son hidrolizados por estas enzimas, de forma que su participación en la resistencia es irrelevante^{326,356}.

La síntesis de *BCRI*, y en cierta medida la impermeabilidad celular, son los mecanismos "centrales" de resistencia a los ABL en *P. aeruginosa*. La producción de niveles bajos, intermedios y elevados de *BCRI* esquematiza 3 poblaciones; en las dos últimas suelen intercalarse, además, cepas con otros marcadores de resistencia relacionados con la permeabilidad de la ME y con la producción de *Blas* plasmídicas. Este trío de poblaciones microbianas se aprecian con claridad al observar el comportamiento y la distribución de los 4.579 aislamientos de *P. aeruginosa* en relación con carbenicilina, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima y moxalactam (Figura 26).

La eficacia de la carbenicilina en *P. aeruginosa* deriva de su escaso poder inductor y su estabilidad a las *BCRI*, aún con un nivel de producción moderado-alto, y de su limitada aptitud selectorora de mutantes desreprimidos²⁶⁹. Por tanto, no es sorprendente encontrar más del 95% de la población inhibida por CMIs entre 2 y 256 ug/ml. Una segunda y exigua población (3,0%) requiere concentraciones de carbenicilina entre 256 y 1024 ug/ml, y en ella, con seguridad, se solapan los 3 mecanismos de resistencia conocidos en *P. aeruginosa*. La última población, asimismo muy reducida (1,4%), la deberían integrar cepas con producción primordial de *Blas* plasmídicas, esencialmente PSE-1 y TEM-1, que proporcionan un nivel de resistencia elevado a todas las penicilinas semisintéticas^{326,327}. Aún admitiendo, que en la 2ª población se intercalaran algunas cepas de *P. aeruginosa* productoras de *Blas* plasmídicas, es evidente la tasa baja de resistencia a carbenicilina en nuestro medio, inferior a la de otros países de nuestro entorno⁵³⁰. Esta distribución bimo-

dal puede interpretarse matemáticamente mediante una ecuación de 3º grado, que proporciona un PCSM (16 ug/ml) coincidente con la moda, y un PCRM fijado en 256 ug/ml por adecuarlo al sistema en base 2, aunque dadas las abscisas de inflexión y del 95% debería estar en torno a 200 ug/ml. Estos criterios de sensibilidad y resistencia son coincidentes, con leves diferencias de ± 1 dilución, con los admitidos en las normas internacionales^{34, 39, 40}.

Cefotaxima y moxalactam son antibióticos con una actividad intrínseca discreta frente a *P. aeruginosa*, caracterizada por un valor modal de 16-32 ug/ml⁵⁸⁶. La distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* parece ser bimodal, en nuestra experiencia, aunque la ausencia de concentraciones superiores a 64 ug/ml en el intervalo nos impide apreciar la presencia de una población claramente resistente (Figura 26). No obstante, se distingue bien una población hipersensible (CMI 0,1-4 ug/ml) y reducida (5%) integrada por cepas con muy bajo nivel de BCRI; y una amplia población "normal" (95%) delimitada por CMIs entre 8 y 64 ug/ml que correspondería al rango intermedio-alto de síntesis de BCRI²⁶⁹. Más que probablemente existe una 3ª población (5%), con CMIs superiores a 64 ug/ml, en la que la hiperproducción enzimática por selección previa de mutantes establemente desreprimidos ocasione CMIs superiores a 256 ug/ml²⁶⁹.

Ceftazidima es un ABL con un merecido prestigio en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*. Conjugua favorablemente 3 factores importantes: su estructura molecular le permite un más fácil acceso al periplasma bacteriano³⁸⁶; su moderada afinidad y baja tasa de hidrólisis por las BCRI le otorgan resistencia a concentraciones moderadas altas del enzima^{206, 386}; y su resistencia elevada a las β las plasmídicas limita, aún más, sus posibilidades de inactivación³⁰². Sólomente su capacidad selectora de mutantes establemente desreprimidos, ensombrece sus amplias posibilidades terapéuticas²⁶⁹. De los resultados conseguidos en nuestro estudio se observa una distribución, una vez más, bimodal de aislamientos de *P. aeruginosa* diferenciándose 2 amplias poblaciones (Figura 26). En la primera y más extensa, 96,8% de los aislamientos (CMI 0,1-16 ug/ml), se aprecian dos subpoblaciones: una comprendida entre 0,1 y 2 ug/ml e integrada por el 77,7% del total; otra delimitada por 4 y 16 ug/ml y más reducida (19,1%). La producción baja-moderada de

BCRI debe ser común en la primera, mientras que niveles intermedios-altos de BCRI, y en algún caso βlas plasmídicas que determinan CMIs entre 2 y 8 ug/ml, responderían de la segunda^{269, 326, 356}. En la población resistente a concentraciones de ceftazidima superiores a 64 ug/ml (3.2%), con toda probabilidad se suman la síntesis de concentraciones muy elevadas de BCRI, con alteraciones en la permeabilidad de la ME que reducen mucho la entrada del antimicrobiano a la célula^{106, 128, 269}.

La aplicación matemática de una ecuación de 2º grado determina, para ceftazidima, un PCSM de 2 ug/ml y un PCRM de 16 ug/ml, también coincidentes en ± 1 dilución con criterios internacionales^{34, 39, 40}, que en nuestra opinión diferencian bien la población sensible de pleno derecho (77.7%), la población con sensibilidad moderada (19.1%), y la población resistente (3.2%). Respecto de aztreonam, la similitud estructural con ceftazidima hace que su comportamiento en *P. aeruginosa* no difiera sino en su menor actividad intrínseca asumida por 1-2 concentraciones. La distribución de aislamientos es superponible, con un ligero desplazamiento a la derecha del intervalo, y los puntos críticos son, asimismo, superiores en una concentración a los de ceftazidima.

En *P. aeruginosa*, de nuevo, la actividad de la carbenicilina diferencia dos grupos amplios de fenotipos de resistencia. En el primero se incluyen el 95.6% de los aislamientos que son sensibles, con un fenotipo microbiológico predominante caracterizado por la sensibilidad a todas las cefalosporinas. Los distintos PCR microbiológicos y farmacocinéticos, distinguen los fenotipos 1 y 2. En el fenotipo 4, 2.5% de incidencia, la producción elevada de BCRI causa la resistencia a cefotaxima, moxalactam, ceftazidima y aztreonam²⁶⁹. Entre los fenotipos resistentes a carbenicilina (4.4%), el fenotipo 4 tiene un patrón coincidente con la escasa incidencia de cepas productoras de βlas plasmídicas⁵⁹², y en el fenotipo 7, 1.3%-1.8% del total de aislamientos, parece más factible la combinación de mecanismos cromosómicos de expresión desreprimida con otros ligados a la impermeabilidad. Así se determina la resistencia a todos los ABL con la excepción, en algunos casos, de los carbapenems, resistentes a las BCRI y cuya entrada a la célula se produce por otras porinas específicas^{134, 135, 269}.

V.- CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1.- La distribución de los microorganismos en un amplio intervalo de CMIs permite la aplicación de un modelo matemático, que hace posible la diferenciación de poblaciones y la obtención de los puntos críticos de sensibilidad (PCSM) y resistencia (PCRM) microbiológica para cada binomio microorganismo-antibiótico betalactámico.

2.- Estos puntos son criterios básicos en la definición de la sensibilidad-resistencia microbiológica. La población inhibida por concentraciones inferiores al PCSM debería considerarse "sensible de pleno derecho". La población inhibida por concentraciones superiores al PCRM debería considerarse resistente. La población comprendida entre ambos puntos sería considerada de "sensibilidad disminuida" y podría ser precursora de cepas resistentes. Estas poblaciones son cuantitativamente diferentes para cada binomio microorganismo-antibiótico betalactámico, y en consecuencia, también difieren los PCSM y PCRM.

3.- Los PCRM obtenidos en nuestro estudio para penicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación en relación con **Enterobacteriaceae**, son muy concordantes con los recomendados por las instituciones internacionales. Por el contrario, están en discrepancia con los que definen la resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam.

4.- Creemos necesaria la estimación de puntos críticos más bajos para cefotaxima, ceftazidima, moxalactam y aztreonam, y por extensión, para todas las cefalosporinas de 3ª generación y monobactams. Por tanto, como resultado de nuestro estudio y con un propósito de uniformidad proponemos como PCRM: 4 ug/ml para **S. marcescens**; 2 ug/ml para **Enterobacter spp.** y **C. freundii**; y 0,5 ug/ml para las restantes **Enterobacteriaceae**.

5.- En *E. coli* los fenotipos prevalentes son resistentes a ampicilina y carbenicilina (58%). La sensibilidad a las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación se ve comprometida en el 4,7% de los aislamientos, cuando se incrementa el nivel de producción de TEM-1 y OXA-1. La resistencia a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam (2,5%) es debida: a la síntesis de betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado (0,1%); a la producción de niveles elevados de OXA-1 (0,1%); y fundamentalmente a la hiperproducción constitutiva de betalactamasa cromosómica (2,4%).

6.- En *E. coli* la actividad selectiva de cefoxitina, ceftazidima y cefpiroma, permite la diferenciación de los patrones de resistencia TEM-1, OXA-1, betalactamasa cromosómica y oxiimino-betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Mientras que la hiperproducción de TEM-1 apenas afecta su actividad, la de OXA-1 interesa específicamente a cefpiroma; la de betalactamasa cromosómica a cefoxitina y ceftazidima, y la de las nuevas betalactamasas de espectro ampliado, excluye a cefoxitina y moxalactam, y motiva la inactivación de las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam.

7.- En *Salmonella*, el patrón más común (93,7%) se caracteriza por la sensibilidad a todos los betalactámicos. Por el contrario, el 20% de las cepas resistentes a ampicilina lleva asociada la resistencia a cefazolina y cefamandol, indicativa de la síntesis elevada de betalactamasas plasmídicas. En 4 cepas de *S. enteritidis* se aprecia cierto grado de resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación, lo que podría conllevar un mecanismo no descrito de hiperproducción de betalactamasa cromosómica similar al referido para *E. coli*.

8.- Los fenotipos predominantes en *Shigella* muestran resistencia a ampicilina y carbenicilina (64%). En dos cepas de *S. sonnei* el patrón de resistencia disociada a ampicilina y carbenicilina y la resistencia a cefoxitina, y cefalosporinas de 3ª generación, sugieren la producción desreprimida de la betalactamasa cromosómica constitutiva de esta especie.

9.- El fenotipo más común en *P. mirabilis* (58%) muestra sensibilidad a todos los betalactámicos. La resistencia asociada a ampicilina, carbenicilina, cefazolina y cefamandol, debida a la producción elevada de TEM-1, es más frecuente que en *E. coli*, aunque la incidencia global de resistencia a ampicilina es inferior. La resistencia disociada a ampicilina y carbenicilina (19%) conforma un grupo de fenotipos sólomente descritos por nosotros. La demostración de un bajo nivel de producción de TEM-1, que afecta poco a carbenicilina, parece responder de este patrón en algunas cepas. En otras, no se puede descartar la síntesis incrementada de betalactamasa cromosómica, especialmente en algunas que muestran resistencia cruzada con cefoxitina, aztreonam y cefalosporinas de 3ª generación.

10.- Los fenotipos de resistencia más usuales en *Klebsiella* (88%) conllevan un grado progresivo de resistencia a ampicilina y carbenicilina. La sensibilidad a todas las cefalosporinas es dominante en la mayoría, 68% del total. Si embargo, se caracterizan 2 fenotipos con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam. En 1,4% de los aislamientos, la resistencia disociada aztreonam-ceftazidima sugiere la codificación de la betalactamasa K1. En 1,6% del total, se identifica retrospectivamente un fenotipo compatible con la síntesis de betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado.

11.- *Yersinia enterocolitica* presenta un patrón uniforme caracterizado por la resistencia a ampicilina y cefazolina, sensibilidad moderada a carbenicilina y franca a cefamandol, cefoxitina, aztreonam y cefalosporinas de 3ª generación. Sin embargo en el 2% de las cepas se aprecia sensibilidad disminuida, CMIs de 1 ug/ml, a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam.

12.- La distribución de fenotipos en *P. vulgaris* revela la escasa incidencia de betalactamasas plasmídicas. El fenotipo predominante, casi el 70% de los aislamientos, muestra sensibilidad a carbenicilina, cefoxitina, aztreonam y cefalosporinas de 3ª generación. La síntesis elevada de oximiino-cefalosporinasas

inducibles, específicas de *P. vulgaris*, debe responder de los fenotipos resistentes a cefotaxima y aztreonam (4%).

13.- *Enterobacter* spp. y *C. freundii* tienen patrones de resistencia superponibles, correspondientes a los tres niveles de producción de BCRI. El fenotipo más frecuente se caracteriza por la resistencia moderada a ampicilina y la sensibilidad a carbenicilina, cefamandol, aztreonam y cefalosporinas de 3ª generación. Los fenotipos de consistencia plasmídica, son más habituales en *C. freundii* (24,6%) que en *Enterobacter* (17,7%). La incidencia de poblaciones con mutantes establemente desreprimidos de BCRI y resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam es mayor en *Citrobacter* (14,7%) que en *Enterobacter* spp. (11,2%). En nuestro medio, su incidencia es discretamente inferior que en otros países de nuestro entorno.

14.- *M. morganii* comparte con *Enterobacter* y *Citrobacter* la síntesis de BCRI como mecanismo esencial de resistencia. No obstante, su fenotipo más común (59%) evidencia la sensibilidad a cefoxitina como expresión de su estabilidad a la BCRI de *Morganella*. Los fenotipos resistentes a las cefalosporinas de 3ª generación y aztreonam son más infrecuentes (9,7%).

15.- En *S. marcescens* la actividad de la carbenicilina es definitiva de dos amplios fenotipos de resistencia. En el más común (58%), se incluyen los fenotipos de resistencia a cefoxitina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima y moxalactam. Su incidencia global del 6,5%, es inferior, en general, a las referidas en la literatura.

16.- Más del 90% de nuestros aislados de *P. aeruginosa* son sensibles a carbenicilina, evidenciando la infrecuencia de las plasmídicas en esta especie. Por otra parte, el bajo índice de resistencia a ceftazidima y aztreonam, 3,5% del total, revela que la población establemente desreprimida hiperproductora de BCRI es limitada.

17.- En general, los datos sobre la evolución de la sensibilidad a antibióticos betalactámicos en **Enterobacteriaceae** y **P. aeruginosa**, indican estabilidad en la incidencia de resistencia en el periodo comprendido entre 1977 y 1986.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Fleming A.** On bacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *B J Experiment Pathol* 1929; 10:226-235.
- 2.- **Courvalin P.** Interpretative reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 1992; 7:368-375.
- 3.- **Moreno López M, Cobacho AR, Dámaso López D, Perea Pérez EJ, Santos Durántez M.** Uso y abuso de los antibióticos. *Epidemiología en la Clínica Puerta de Hierro. I Symposium Internacional sobre antibióticos en Medicina Hospitalaria.*, Monografías científicas Beecham nº 1, Madrid, pp:51-60. 1968.
- 4.- **Pollock MD.** Origin and function of penicillinase: a problem in biochemical evolution. *Br Med J* 1967; 4:71-77.
- 5.- **Smith DH.** R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946. *J Infect* 1967; 94:2071-2072.
- 6.- **Thompson CJ, Gray GS.** Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene and its relation to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:5190-5194.
- 7.- **Datta N, Hughes VM.** Plasmid of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 1983; 306:616-617.
- 8.- **Kirby WMM.** Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin. *Science* 1944; 99:452-453.
- 9.- **Barry AL.** Definition of terms "resistant" and "susceptible". In: Barry AL (Ed). *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices.* Lea-Febiger, Philadelphia. pp:12-29. 1976.
- 10.- **Courvalin.** Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1019-1023.
- 11.- **Stratton CW.** In vitro testing: correlations between bacterial susceptibility, body fluid levels and effectiveness of antibacterial therapy. In: Lorian V (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Williams and Wilkins, Baltimore. pp:849-879. 1991.
- 12.- **Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA.** Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Churchill Livingstone, New York. pp:218-228. 1990
- 13.- **Kopecko DJ.** Involvement of specialized recombination in the evolution and expression of bacterial genes. In: Stuttgart C, Rozel KR (Ed). *Plasmids and transposons.* Academic Press, New York. pp:165-206. 1980.
- 14.- **Lupski JR.** Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. *Rev Infect Dis* 1987; 9:357-368.
- 15.- **Jacoby GA, Archer GL.** New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Eng J Med* 1991; 324:601-612.

-
- 16.- Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J (Ed). L'Antibiogramme. MPC-Videom, Paris. 1985.
- 17.- Ouellete M, Rossi JJ, Bazin R, Roy PH. Oligonucleotide probes for the detection of TEM-1 and TEM-2 β -lactamase genes and their transposons. Can J Microbiol 1986; 33:205-211.
- 18.- De Manchi JM. The polymerase chain reaction. Clin Microbiol Newsl 1990; 12:81-84.
- 19.- Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Eng J Med 1990; 322:178-183.
- 20.- Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 1991; 252:1643-1651.
- 21.- Mabilat C, Courvalin P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2210-2216.
- 22.- Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside enzymes in gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2164-2168.
- 23.- Martínez-Beltrán J. Le concept des valeurs critiques dans l'interprétation d'antibiogramme. Etat actuel de la question en Espagne. Symposium 1, Antibiogramme: Comparaison entre méthodes, automatisme, valeurs critiques. 2^e Congrès Méditerranéen de Chimiothérapie, Niza (France). 1980.
- 24.- Wheat PF, Spencer RC. The evolution of in-vitro antimicrobial susceptibility techniques. J Antimicrob Chemother 1988; 22:579-582.
- 25.- Vincent JG, Vincent HV. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1944; 55:162-164.
- 26.- World Health Organization. Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests. Second report of the expert committee on antibiotics. WHO Technical Report Series N^o 210, WHO, Geneva. 1961.
- 27.- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-496.
- 28.- Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand Sec B 1971; 217 Suppl:1-90.
- 29.- Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility tests: automation and mechanization. In: Habermehl KO (Ed). Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin. pp:475-483. 1984.
- 30.- Frisk AR. Bestämning av penicillin-koncentration och penicillinkäsligheten. Nordisk Medicin 1945; 28:2249-2252.

-
- 31.- Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotics and Chemotherapy* 1959; 9:307-311.
- 32.- Novick WJ. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. *Clin Microbiol Newsletter* 1989; 11:60-62.
- 33.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A4. NCCLS, Villanova PA. 1990.
- 34.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A2. NCCLS, Villanova PA. 1990.
- 35.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Proposed guideline M26-P. NCCLS, Villanova PA. 1987.
- 36.- The Swedish Reference Group for Antibiotics. A revised system for antibiotic sensitivity testing. *Scand J Infect Dis* 1981; 13:148-152.
- 37.- Deutsches Institut für Normung. Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. DIN 58940, 1984.
- 38.- Werkgroep Richtlijnen Govoeligheidsbepalingen Report. Standaardisatie van Govoeligheidsbepalingen. WRG, Bilthoven, 1981.
- 39.- Phillips I. A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antimicrobial Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 Suppl D:1-50.
- 40.- Acar J, Bergogne-Bérézin E, Chabbert Y, et al. Communiqué 1991 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Path Biol* 1991; 7:737-740.
- 41.- Mensura I. Reunión de la mesa española de normalización de la sensibilidad a los antibióticos. *Enf Infec Microbiol Clin* 1991; 9:449-450.
- 42.- European Committee for Clinical Laboratory Standards. ECCLS standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods. ECCLS Document 5, N° 4, Lund, Sweden. 1989.
- 43.- Bakken JS. The many faces of MIC breakpoints: do they tell the story like it is? *Clin Microbiol Newsletter* 1992; 14:94-96.
- 44.- Hamilton-Miller JMT. Susceptibility testing methods: in defence of the MIC. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27:138-140.
- 45.- Nichols WW. Towards a fundamental understanding of the MIC of β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22:275-283.

-
- 46.- Baquero F. European standards for antibiotic susceptibility testing: towards a theoretical consensus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 492-495.
- 47.- Greenwood D. In vitro veritas? Antimicrobial susceptibility test and their clinical relevance. *J Infect Dis* 1981; 144:380-385.
- 48.- Moellering Jr RC. Principles of anti-infective therapy. In: Mandell GL, Douglas Jr RG, Bennett JE (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York. pp:206-217. 1990.
- 49.- Washington JA. Discrepancies between in vitro activity of and in vivo response to antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983; 1:25-31.
- 50.- Sanders CC. A problem with antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* 1991; 57:187-190.
- 51.- Murray PR. Clinical predictive value of in vitro susceptibility tests. *Clin Microbiol Newsletter* 1990; 12:44-45.
- 52.- Stratton CW. Susceptibility testing today: myth, reality and new direction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988; 9:624-267.
- 53.- Sanders WE, Sanders CC. Do in vitro antimicrobial susceptibility tests accurately predict therapeutic responsiveness in infected patients? In: V. Lorian (Ed). *Significance of Medical Microbiology in the Care of Patients*. Williams and Wilkins, Baltimore. pp:325-340. 1982.
- 54.- Ernest JD, Sande MA. In vitro susceptibility testing and the outcome of treatment of infection. In: RK Root, MA Sande (Ed). *New Dimensions in Antimicrobial Therapy*. Churchill Livingstone, New York. pp:293-311. 1984.
- 55.- McCabe WR, Treadwell TL. In vitro susceptibility tests: correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients. In: V. Lorian (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore. pp:925-937. 1986.
- 56.- Lorian V, Burns L. Predictive value of susceptibility tests for the outcome of antibacterial therapy. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25:175-181.
- 57.- Volgelman B, Craigh WA. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr* 1986; 108:835-840.
- 58.- Drusano GL. Role of pharmacokinetics in the outcome of infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:289-297.
- 59.- Jenkins SG. Approaches to antibiograms and formulary-based antibiotic reporting. *Clin Microbiol Newsletter* 1990; 12:30-32.
- 60.- Isenberg HD. Clinical evaluation of laboratory guidance to antibiotic therapy. *Health Lab Sci* 1967; 4:166-180.
- 61.- Weinstein L, Dalton AC. Host determinants of response to antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1968; 279:407-473, 524-531, 580-588.

-
- 62.- Rolinson GN. β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1986; 17:5-36.
- 63.- Neu HC. Penicillins. In: GL Mandell, RG Douglas Jr, JE Bennett (Ed), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York. pp 230-246. 1990.
- 64.- Donowitz GR, Mandell GL. Cephalosporins. In: GL Mandell, RG Douglas Jr, JE Bennett (Ed), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York. pp 246-257. 1990.
- 65.- Neu HC. Other β -lactam antibiotics. In: GL Mandell, RG Douglas Jr, JE Bennett (Ed), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York. pp 257-264. 1990.
- 66.- Selwyn S. The discovery and evolution of the penicillins and cephalosporins. In: S Selwyn (Ed.). The Betalactam Antibiotics: Penicillins and Cephalosporins in Perspective. Holder and Stoughton, London. pp 1-55. 1980.
- 67.- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940; 373:837.
- 68.- Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, et al. Further observations on penicillin. Lancet 1941; 2:177-189.
- 69.- Behrens OK, Corse J, Edwards JP, et al. Biosynthesis of penicillin. IV. New crystalline biosynthetic penicillins. J Biol Chem 1948; 175:793-809.
- 70.- Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JHC, Rolinson GN. Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillins fermentations. Nature 1948; 183:257-258.
- 71.- Rolinson GN. 6-APA and the development of the β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother, 1979; 5:7-14.
- 72.- Rolinson GN, Stevens S, Batchelor FR, Wood JC, Chain EB. Bacteriological studies on a new penicillin - BRL 1241. Lancet 1960; 2:564-567.
- 73.- Rolinson GN, Stevens S. Microbiological studies on a new broad-spectrum penicillin, "Penbritin". Br Med J 1961; 2:191-196.
- 74.- Sutherland R, Croydon EAP, Rolinson GN. Amoxicillin: a new semi-synthetic penicillin. Br Med J 1972; 3:13-16.
- 75.- Lund F, Tybring L. 6- β -amidinopenicillanic acids - a new group of antibiotics. Nature New Biol 1972; 236:135-137.
- 76.- Knudsen ET, Rolinson GN, Sutherland R. Carbenicillin: a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Br Med J 1967; 3:75-78.
- 77.- Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH, et al. BRL 17421 a novel β -lactam antibiotic, highly resistant to β -lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. Antimicrob Agents Chemother 1981; 20:38-46.

-
- 78.- Neu HC. Structure-activity relationships of new beta-lactam compounds and in vitro activity against common bacteria. Rev Infect Dis 1983; 5 Suppl 2 :319-336.
- 79.- Neu HC. Beta-lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties. Rev Infect Dis 1986; 8 Suppl 3 :237-259.
- 80.- Brotzu G. Ricerche su di un nuova antibiotico. Lavori dell' Istituto d'Igiene di Cagliari 1948; 1-11.
- 81.- Newton GGF, Abraham EP. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-a-aminoadipic acid. Nature 1955; 175:548.
- 82.- Abraham EP, Newton GGF. The structure of cephalosporin C. Biochem J 1961; 79:377-393.
- 83.- Symposium. Clinical symposium on cefazolin. J Infect Dis 1973; 128: Suppl.
- 84.- Symposium. Cefamandole. J Infect Dis 1978; 137:Suppl.
- 85.- Stapley EO, Jackson M, Hernandez S, et al. Cephamycins, a new family of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1972; 2:122-131.
- 86.- Symposium. Cefoxitin: microbiology, pharmacology and clinical use. J Antimicrob Chemother 1978; 4:Suppl B.
- 87.- Neu HC. The new beta-lactamase-stable cephalosporins. Ann Inter Med 1982; 97:408-417.
- 88.- Symposium. Cefotaxime: a new cephalosporin antibiotic. J Antimicrob Chemother 1980; 6:Suppl A.
- 89.- Symposium. Ceftazidime. J Antimicrob Chemother 1981; 8:Suppl B.
- 90.- Yoshida T, Matsuura S, Mayama M, Kameda Y, Kuwahara S. Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa- β -lactam with an expanded antibacterial spectrum: laboratory evaluation. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17:302-312.
- 91.- Sykes RB, Bonner DP. Discovery and development of the monobactams. Rev Infect Dis 1985; 7 Suppl:579-604.
- 92.- Symposium. Azthreonam, a synthetic monobactam. J Antimicrob Chemother 1981; 8:Suppl E.
- 93.- Brown AG, Butterworth D, Cole M, et al. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. J Antibiot 1976; 29:668-669.
- 94.- Bush K. β -lactamase inhibitors in perspective. J Antimicrob Chemother 1983; 11:97-107.
- 95.- Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a betalactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob Agents Chemother 1977; 11: 852-857.

-
- 96.- Brogden RN, Carmine A, Heel RC, Morley PA, Speigi TM, Avery GS. Amoxycillin/clavulanic acid: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs* 1981; 22:337-362.
- 97.- Jacobs MR, Aronoff SC, Johenning S, Shlaes DM, Yamabe S. Comparative activities of the β -lactamase inhibitors YTR-830, clavulanate, and sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined β -lactamase producing aerobic gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:980-985.
- 98.- Coleman K, Griffin DRJ, Page JWJ, Upshon PA. In vitro evaluation of BRL 42715, a novel β -lactamase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1580-1587.
- 99.- Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Rolinson GN. Olivanic acids, a family of beta-lactam antibiotics with beta-lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. I. Detection, properties and fermentation studies. *J Antibiot* 1979; 32:287-294.
- 100.- Kaham JS, Kahan FM, Goegelman SA, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot* 1979; 32:1-12.
- 101.- Symposium. A perspective of imipenem. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12: Suppl D.
- 102.- Symposium. Meropenem (SM7338) a new carbapenem. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24:Suppl A.
- 103.- Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, 1985; 45:1-32.
- 104.- Nikaido H. Role of permeability barriers in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*, 1985; 27:197-231.
- 105.- Nikaido H. Role of the outer membrane of gram-negative bacteria in antimicrobial resistance. In: LE Bryan (Ed), *Microbial Resistance to Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp 1-34. 1989.
- 106.- Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1831-1836.
- 107.- Labischinski H, Barnickel G, Bradaczek H, Naumann D, Rietschel ET, Giesbrecht P. High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984; 25:539-544.
- 108.- Gutmann L, Williamson R, Collatz E. The possible role of porins in bacterial antibiotic resistance. *Ann Intern Med*, 1984; 101:554-557.
- 109.- Zimmermann W, Rosselet A. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1977; 12:368-372.

-
- 110.- Mitsuyama J, Iruma R, Yamaguchi A, Saway T. Identification of porins in the outer membrane of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31:379-384.
- 111.- Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of β -lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:84-92.
- 112.- Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: Studies with β -lactams in intact cells. *J. Bacteriol*, 1983; 153:232-240.
- 113.- Murakami K, Yoshida T. Penetration of cephalosporins and corresponding 1-oxacephalosporin through the outer layer of gram-negative bacteria and its contribution to antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; 21:254-258.
- 114.- Nikaido H, Liu W, Rosenberg EY. Outer membrane permeability and β -lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxymino substituents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:337-342.
- 115.- Sanders CC. Novel resistance selected by the new expanded-spectrum cephalosporins: a concern. *J Infect Dis*, 1983; 147:585-589.
- 116.- Vu H, Nikaido H. Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:393-398.
- 117.- Sawai T, Matsuba K, Yamagishi S. A method for measuring the outer membrane permeability of β -lactam antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Antibiot* 1977; 30:1134-1136.
- 118.- Nikaido H, Normak S. Sensitivity of *Escherichia coli* to various β -lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β -lactamases: a quantitative predictive treatments. *Mol Microbiol*, 1987; 1:29-36.
- 119.- Livermore DM. Kinetics and significance of the activity of the Sabath and Abraham's β -lactamase of *Pseudomonas aeruginosa* against cefotaxime and cefsulodin. *J Antimicrob Chemother*, 1983; 11:169-179.
- 120.- Frère JM. Quantitative relationship between sensitivity to β -lactam antibiotics and β -lactamase production in gram-negative bacteria. I Steady-state treatment. *Biochem. Pharmacol* 1989; 38:1415-1426.
- 121.- Medeiros AA, O'Brien TF, Rosenberg EY, Nikaido H. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J Infect Dis*, 1987; 156:751-757.
- 122.- Sawai T, Hiruma R, Kawana N, Kaneko M, Taniyasu F, Inami A. Outer membrane permeation of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1982; 22:585-592.

-
- 123.- Then RL, Angehrn P. Multiply resistant mutants of *Enterobacter cloacae* selected by β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30: 684-688.
- 124.- Werner V, Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV. Role of β -lactamase and outer membrane proteins in multiple β -lactamase resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1985; 25:455-459.
- 125.- Goldstein FW, Gutmann L, Willianson R, Collatz E, Acar JF. In vivo and in vitro emergence of simultaneous resistance to both β -lactam and aminoglycoside antibiotics in a strain of *Serratia marcescens*. *Ann Microbiol (Paris)*, 1983; 134:329-337.
- 126.- Gutmann L, Chabbert YA. Different mechanisms of resistance to latamoxef(moxalactam) in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother*, 1984; 13:15-22.
- 127.- Traub WH, Bauer D. Outer membrane protein alteration in *Serratia marcescens* resistant against aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *Chemotherapy*, 1987; 33:172-176.
- 128.- Nikaido H, Hancock REW. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. In: JR Sokatch (ed), *The Bacteria*, vol 10. Academic Press, Orlando. pp 145-193. 1986.
- 129.- Parr TR Jr, Moore RA, Moore LV, Hancock REW. Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31:121-123.
- 130.- Yoshimura F, Zalman LS, Nikaido H. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J Biol Chem*, 1983; 258:2308-2314.
- 131.- Livermore DM, Williams RJ, Williams JD. In-vitro activity of MK0787 (N-formimidoyl thienemycin) against *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative rods and its stability to their β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8:355-362.
- 132.- Quinn JP, Dudek EJ, DiVincenzo CA, Lucks DA, Lerner SA. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*, 1986; 154:289-294.
- 133.- Büscher KH, Cullman W, Dick W, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987; 31:703-708.
- 134.- Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:52-57.
- 135.- Livermore DM, Yang Y. Comparative activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains with well characterized resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 Suppl:149-159.

-
- 136.- Margaret BS, Drusano GL, Standiford HC. Emergence of resistance to carbapenem antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1989; 24 Suppl:161-167.
- 137.- Vaara M, Vaara T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24:107-113.
- 138.- Godfrey AJ, Hatlelid L, Bryan LE. Correlation between lipopolysaccharide structures and permeability resistance in β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1984; 26:181-186.
- 139.- Harder KJ, Nikaido H, Matsushashi M. Mutant of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the OmpF porin. Antimicrob Agents Chemother, 1981; 20:549-552.
- 140.- Jaffé A, Chabbert YA, Derlot E. Selection and characterization of β -lactam-resistant *Escherichia coli* K-12 mutants. Antimicrob Agents Chemother, 1983; 23:622-625.
- 141.- Komatsu Y, Murakami K, Nishikawa T. Penetration of moxalactam into its target proteins in *Escherichia coli* K-12: comparison of a highly moxalactam-resistant with its parent strain. Antimicrob Agents Chemother 1981; 20:613-619.
- 142.- Bush K, Tanaka SK, Bonner DP, Sykes RB. Resistance caused by decreased penetration of β -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother, 1985; 27:555-560.
- 143.- Gutmann L, Billot-Klein D, Williamson R, et al. Mutation of *Salmonella paratyphi* A conferring cross-resistance to several groups of antibiotics by decreased permeability and loss of invasiveness. Antimicrob Agents Chemother, 1988; 32:195-201.
- 144.- Gutmann L, Williamson R, Moreau N, et al. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. J Infect Dis 1985; 151:501-507.
- 145.- Marchou B, Bellido F, Charnas R, Lucain C, Pechère J-C. Contribution of β -lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:1589-1595.
- 146.- Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV, Werner V. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, β -lactams and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drugs classes. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26:797-801.
- 147.- Sanders CC, Watanakunakorn C. Emergence of resistance to β -lactams, aminoglycosides, and quinolones during combination therapy for infections due to *Serratia marcescens*. J Infect Dis, 1986; 153:617-619.

-
- 148.- Bakken JS, Sanders CC, Thomson KS. Selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*: association with changes in outer membrane protein. *J Infect Dis* 1987; 155:1220-1225.
- 149.- Iyer R, Darby V, Holland IB. Alterations in the outer membrane proteins of *Escherichia coli* B/r associated with the presence of the R plasmid rRM98. *FEBS Lett* 1978; 85:127-132.
- 150.- Rossouw FT, Rowbury RJ. Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. *J Appl Bacteriol* 1984; 56:63-79.
- 151.- Livermore D, Pitt TL. Dissociation of surface properties and "intrinsic" resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1986; 22:217-224.
- 152.- Piddock LJV, Wijnands WJA, Wise R. Quinolone/ureidopenicillin cross-resistance. *Lancet* 1987; ii:907.
- 153.- Moellering Jr RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 Suppl A:1-7.
- 154.- Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem*, 1983; 52:825-869.
- 155.- Gardner AD. Morphological effects of penicillins on bacteria. *Nature*, 1940; 146:837-838.
- 156.- Duguid JP. The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. *Edinburgh Med J*, 1946; 53:401-412.
- 157.- Cooper PD. Site of action of radiopenicillin. *Bacteriol Rev*, 1956; 20:28-48.
- 158.- Park JT. Uridine 5'pyrophosphate derivatives. Aminoacid containing derivatives. *J Biol Chem*, 1952; 194:897-904.
- 159.- Ghuysen JM. Biosynthesis and assembly of bacterial cell walls. *Cell Surf Rev*, 1977; 4:463-596.
- 160.- Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965; 54:1133-1141.
- 161.- Georgopapadakou NH, Liu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1980; 18:148-157.
- 162.- Tomasz A. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Ann Inter Med*, 1982; 96:502-504.
- 163.- Georgopapadakou NH, Sykes RB. Bacterial enzymes interacting with beta-lactam antibiotics. *Exp Pharmacol* 1983; 67:1-8.

-
- 164.- **Spratt BG.** Penicillin-binding proteins and the future of β -lactam antibiotics. The seventh Fleming lecture. *J Gen Microbiol*, 1983; 129:1247-1260.
- 165.- **Malouin F, Bryan LE.** Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30:1-5.
- 166.- **Chambers HF.** Understanding penicillin-binding proteins. *Antimicrob Newsl*, 1987; 3:47-54.
- 167.- **Neu HC.** Penicillin-binding-proteins and beta-lactamases: their effects on the use of cephalosporins and other new beta-lactams. In: JS Remington, MN Swartz (Eds), *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*; Vol 8:37-61. 1987.
- 168.- **Spratt BG, Cronie KD.** Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis*, 1988; 699-711.
- 169.- **Spratt BG.** Resistance to β -lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. In: LE Bryan (Ed), *Microbial Resistance to Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp:77-100. 1989.
- 170.- **Tipper DJ, Strominger JL.** Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *J Biol Chem*, 1968; 243:3169-3179.
- 171.- **Tipper DJ, Wright A.** The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. In: JR Sokatch, LN Ornston (Eds), *The Bacteria: A Treatise on Structure and Function*, Vol VII. Academic Press, Orlando. pp 291-426. 1979.
- 172.- **Shockman GD, Barrett JF.** Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1983; 37:501-527.
- 173.- **Spratt BG.** Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem*, 1977; 72:341-352.
- 174.- **Spratt BG.** Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72:2999-3003.
- 175.- **Spratt BG, Pardee AB.** Penicillin-binding proteins and cell saphe in *E. coli*. *Nature* 1975; 254:516-517.
- 176.- **Tomasz A, Waks S.** Mechanism of action of penicillin: Triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad USA*, 1975; 72:4162-4166.
- 177.- **Ishino F, Matsubashi M.** Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 101:905-911.
- 178.- **Tomioka S, Ishino F, Tamaki S, Matsubashi M.** Formation of hyper-crosslinked peptidoglycan with multiple cross-linkages by a penicillin-binding protein, 1A, of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 106:1175-1182.

-
- 179.- Nakagawa **JI**, Tamaki **S**, Tomioka **S**, Matsuhashi **M**. Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides: penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem*, 1984; 259:13937-13946.
- 180.- Chase **HA**, Fuller **C**, Reynolds **PE**. The role of penicillin-binding proteins in the action of cephalosporins against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem*, 1981; 117-301.
- 181.- Suzuki **H**, Van Heijenoort **Y**, Tamura **T**, Mizoguchi **J**, Hirota **Y**, Van Heijenoort **T**. In vitro peptidoglycan polymerization catalyzed by penicillin-binding proteins 1B of *Escherichia coli* K12. *FEBS Lett*, 1980; 110:245-249.
- 182.- Ishino **H**. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J Biol Chem*, 1986; 261:7024-7031.
- 183.- Matsuhashi **M**. Mutants of *Escherichia coli* lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74:2976-2979.
- 184.- Suzuki **H**, Nishimura **Y**, Hirota **Y**. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in penicillin-binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1978; 75:664-668.
- 185.- Frere **JM**, Joris. Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1985; 11:299-396.
- 186.- Curtis **NAC**, Orr **D**, Ross **GW**, Boulton **MG**. Competition of beta-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus rettgeri*, and *Escherichia coli*: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979; 16:325-328.
- 187.- Ohya **S**, Yamazaki **M**, Sugawara **S**, Matsuhashi **M**. Penicillin-binding proteins in *Proteus* species. *J Bacteriol*, 1979; 137:474-479.
- 188.- Noguchi **H**, Matsuhashi **M**, Mitsuhashi **S**. Comparative studies of penicillin-binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1979; 100:41-49.
- 189.- Spratt **BG**. *Escherichia coli* resistance to β -lactam antibiotics through a decrease and the affinity of a target for lethality. *Nature*, 1978; 274:713-715.
- 190.- Fontana **R**. Penicillin-binding proteins and the intrinsic resistance to β -lactam in gram-positive cocci. *J Antimicrob Chemother*, 1985; 16:412-416.
- 191.- Tomasz **A**. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of β -lactam antibiotics. *Rev Infect Dis*, 1986; 8 Suppl 3 :S260-278.
- 192.- Hedge **PJ**, Spratt **BG**. Amino acid substitutions that reduce the affinity for penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* for cephalixin. *Eur J Biochem*, 1985; 151:111-121.

-
- 193.- Hedge PJ, Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modeling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature* 1985; 318:478-480.
- 194.- Mirelman D, Nuchmowitz Y, Rubinstein E. Insensitivity of peptidoglycan biosynthetic reactions to β -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1981; 19:687-695.
- 195.- Godfrey AJ, Bryan LE, Rabin HR. β -lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 1981; 19:705-711.
- 196.- Hamilton-Miller JMT. An historical introduction to β -lactamase. In: JMT Hamilton-Miller, JT Smith (Eds), *Beta-lactamases*. Academic Press, London. pp 1-16; 1979.
- 197.- Novick R. Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1963; 33:121-136.
- 198.- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1965; 208:239-241.
- 199.- Hedges RW, Jacob AE. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet* 1974; 132:31-40.
- 200.- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88:169-178.
- 201.- Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:3737-3741.
- 202.- Matthew M, Harris AM. Identification of β -lactamases by analytical isoelectric focusing; correlation with bacterial taxonomy. *J Gen Microbiol* 1976; 94:55-67.
- 203.- Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamase of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5:349-358.
- 204.- Percival A, Rowlands J, Corkhill JE, Alergant CD, Arya OP, Rees E. Penicillinase-producing gonococci in Liverpool. *Lancet* 1976; 2:1379-1382.
- 205.- Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable β -lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest* 1983; 72:1168-1171.
- 206.- Sanders CC. The chromosomal beta-lactamases. In: LE Bryan (Eds), *Microbial resistance to drugs*. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp 130-149. 1989.
- 207.- Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-1136.

-
- 208.- Gardner P, Smith DH, Berr H, Moellering RC. Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. *Lancet* 1969; 2: 774-776.
- 209.- Sykes RB, Matthew M. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2:115-157.
- 210.- Ozer JH, Lowry DC, Saz AK. Derepression of β -lactamase (penicillinase) in *Bacillus cereus* by pepetidoglycans. *J Bacteriol* 1970; 102:52-63.
- 211.- Richmond MH and Sykes RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In: AH Rose and DW Tempest (eds), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, London. Vol 9; pp:31-88. 1973.
- 212.- Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:6-10.
- 213.- Eisenthal R, Cornish-Bowden A. A new graphical procedure for estimating kinetic parameters. *Biochem J* 1974; 139:715-720.
- 214.- Samuni A. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the β -lactamase reaction. *Anal Biochem* 1975; 63:17-26.
- 215.- Livermore DM. Do β -lactamases "trap" cephalosporins? *J Antimicrob Chemother* 1985; 15:511-521.
- 216.- Medeiros AA. Plasmid-determined beta-lactamases. In: LE Bryan LE (Eds), *Microbial Resistance to Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp: 101-127. 1989.
- 217.- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; 289:321-331.
- 218.- Jaurin B, Grundstrom T. Amp C cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:4897-4901.
- 219.- Bergstrom S, Olsson O, Normark S. Common evolutionary origin of chromosomal beta-lactamase genes in enterobacteria. *J Bacteriol* 1982; 150:528-534.
- 220.- Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. The sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:134-136.
- 221.- Waxman DJ, Amanuma H, Strominger JL. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the active site serine in two bacterial L-alanine carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:2730-2734.
- 222.- Waxman DJ, Amanuma H, Strominger JL. Amino acid sequence homologies between *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 and A beta-lactamases. *FEBS Lett* 1982; 139:159-163.

-
- 223.- Kelly JA, Kideberg O, Charlier P, et al. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science* 1986; 231:1413-1429.
- 224.- Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J Clin Invest* 1985; 76:325-331.
- 225.- Boyce JM, Medeiros AA. Role of beta-lactamase in expression of resistance by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1426-1428.
- 226.- Amaral L, Lee Y, Schwarz U, Lorian V. Penicillin-binding site on the *Escherichia coli* cell envelope. *J Bacteriol* 1986; 167:492-495.
- 227.- O'Callaghan CH, Muggleton PW, Ross GW. Effects of β -lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. In: GL Hobby (Ed), *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology, Bethesda. pp:57-63. 1968.
- 228.- Masuda G, Tomioka S, Hasegawa M. Detection of β -lactamase production by gram-negative bacteria. *J Antibiot* 1976; 24:662-664.
- 229.- McGhie D. Detection of β -lactamase activity of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Pathol* 1977; 30:585-587.
- 230.- Perret CJ. Iodometric assay of penicillinase. *Nature (London)* 1954; 174:1012-1013.
- 231.- Hou JP, Poole JW. β -lactam antibiotics: their physico-chemical properties and biological activities in relation to structure. *J Pharm Scienc* 1972; 60:503-532.
- 232.- Orstravik I, Odegaard K. A simple test for penicillinase production in *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; 79:855-856.
- 233.- Boxer GE, Everett PM. Colorimetric determination of benzyl penicillin. *Anal Chem* 1949; 21:670-673.
- 234.- O'Callaghan CH, Morris A, Kirby S, Shingler AH. Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 1:283-288.
- 235.- Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:259-263.
- 236.- Veccoli C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA, O'Leary JR. A comparison of polyacrylamide and agarose gel thin-layer isoelectric focusing for the characterization of beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:186-189.
- 237.- Sanders CC, Sanders WE Jr, Moland ES. Characterization of beta-lactamases in situ on polyacrylamide gels. *Antimicrob Agents Chemoter* 1986; 30: 951-952.

-
- 238.- Cartwright SJ, Waley SG. β -lactamase inhibitors. Med Res Rev 1983; 3: 341-382.
- 239.- Papanicolau GA, Medeiros AA. Discrimination of extended-spectrum β -lactamases by a novel nitrocefin competition assay. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2184-2192.
- 240.- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzlinf RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28:302-307.
- 241.- Levesque RC, Medeiros AA, Jacoby GA. Molecular cloning and DNA homology of plasmid-mediated beta-lactamase genes. MGG 1987; 206:252-258.
- 242.- Couture F, Lachepelle J, Levesque RC. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D β -lactamases. Mol Microbiol 1992; 6:1693-1705.
- 243.- Jouvenot M, Deschaseaux ML, Royez M, et al. Molecular hybridization versus isoelectric focusing to determine TEM-type beta-lactamases in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:300-305.
- 244.- Huovinen S, Huovinen P, Jacoby GA. Detection of plasmid-mediated beta-lactamases using DNA probes. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:175-179.
- 245.- Richmond MH. Purification and properties of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. Biochem J 1963; 88:452-459.
- 246.- Richmond MH. Wild-type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. Biochem J 1965; 94:584-593.
- 247.- Rosdahl VT. Naturally occurring constitutive β -lactamase of novel serotype in *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol 1973; 77:229-231.
- 248.- Richmond MH. β -lactamase (*Staphylococcus aureus*). Methods Enzymol 1975; 43:664-672.
- 249.- Dyke KGH. β -lactamases of *Staphylococcus aureus*. In: JMT Hamilton-Miller, JT Smith (Eds), Beta-lactamases. Academic Press, London. pp:291-310. 1979.
- 250.- Zygmunt DJ, StrattonCW, Kernodle DS. Characterization of four β -lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 16:440-445.
- 251.- McDonnell RW, Sweendy HM, Cohen S. Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmid intra- and inter-specifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 151-160.
- 252.- Goering RV, Ruff EA. Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24:450-452.

-
- 253.- **Lopardo H, Casimir L, Hernandez C, Rubeglio E.** Isolation of three strains of β -lactamase producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:402-405.
- 254.- **Murray BE, Sing KV, Markowitz SM, et al.** Evidence for clonal spread of a single strain of β -lactamase-producing *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* to six hospitals in five states. J Infect Dis 1991; 163:780-785.
- 255.- **Ayliffe GAC.** Ampicillin inactivation and sensitivity of coliform bacilli. J Gen Microbiol 1963; 30:339.
- 256.- **Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S.** Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to p-aminobenzylpenicillin. Jpn J Microbiol 1968; 12:423-434.
- 257.- **Jack GW, Richmond MH.** A comparative study of eight distinct beta-lactamases synthesized by gram-negative bacteria. J Gen Microbiol 1970; 61:43-61.
- 258.- **Mitsuhashi S, Yamagishi S, Sawai T, Kawabe H.** Biochemical mechanisms of plasmid-mediated resistance. In: S Mitsuhashi (Ed), R Factor Drug Resistance Plasmid. University of Tokyo Press, Tokyo. pp:195-251. 1977.
- 259.- **Matthew M, Hedges RW, Smith JT.** Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. J Bacteriol 1979; 138:657-662.
- 260.- **Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH.** Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:7378-7382.
- 261.- **Medeiros AA.** Beta-lactamases. Br Med Bull 1984; 40:18-27.
- 262.- **Medeiros AA, Jacoby GA.** Beta-lactamase-mediated resistance. In: SF Queener, JA Webber, SW Queener (Eds), Beta-Lactam Antibiotics for Clinical Use. Dekker, New York. pp:49-84. 1986.
- 263.- **Chamberland S.** Beta-lactamases: Genetic control. In: LE Bryan (Ed), Microbial Resistance to Drugs. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp:151-167. 1989.
- 264.- **Mitsuhashi S, Inoue M.** Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In: S Mitsuhashi (Ed), Beta-lactam antibiotics. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. p:41. 1981.
- 265.- **Lindberg F, Normark S.** Contribution of chromosomal β -lactamases to β -lactam resistance in enterobacteria. Rev Infect Dis 1986; 8 Suppl :S292-304.
- 266.- **Sanders CC, Sanders WE Jr.** Type I β -lactamases of gram-negative bacteria: interactions with β -lactam antibiotics. J Infect Dis 1986; 154:792-800.
- 267.- **Curtis NA, Eisenstadt RL, Rudd C, White AJ.** Inducible type I β -lactamases of gram-negative bacteria and resistance to β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1986; 17:51-61.

-
- 268.- **Livermore DM.** Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:439-445.
- 269.- **Livermore DM.** Chromosomal beta-lactamase induction and stable derepression in relation to antibiotic resistance in gram-negative bacteria. In: DM Livermore (Ed), *Beta-lactamases: Current Perspectives*. Theracom Ltd, The Hague, The Netherlands. pp:13-26. 1987.
- 270.- **Collatz E, Gutmann L, Williamson R, Acar JF.** Development of resistance to β -lactam antibiotics with special reference to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14(Suppl B): 13-21.
- 271.- **Perronne C, Régnier B, Legrand P, et al.** Failure of new beta-lactam antibiotics in the treatment of severe infections caused by *Enterobacter cloacae*. *Press Med* 1986; 15:1813-1818.
- 272.- **Bush K, Freudenberg JS, Sykes RB.** Interaction of azthreonam and related monobactams with β -lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22:414-420.
- 273.- **Emanuel EL, Gagnon J, Waley SG.** Structural and kinetic studies on β -lactamase K1 from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem J* 1986; 234:343-347.
- 274.- **Bush K.** Recent developments in β -lactamase research and their implications for the future. *Rev Infect Dis* 1988; 10:681-690.
- 275.- **Bush K.** Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b, 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:264-270.
- 276.- **Bush K.** Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:271-276.
- 277.- **Jacoby G, Medeiros AA.** More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1697-1704.
- 278.- **Datta N.** Plasmids as organisms. In: DR Helinski, SN Cohen, DB Clevwell, et al (Eds), *Plasmid in Bacteria*. Plenum Press, New York. pp:383-395. 1985.
- 279.- **Timmis KN, González-Carrero MI, Sekizaki T, et al.** Biological activities specified by antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18:1-12.
- 280.- **Thompson R.** R plasmid transfer. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 13-26.
- 281.- **Matthew M, Hedges RW.** Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J Bacteriol* 1976; 125:713-718.
- 282.- **Jacoby GA, Matthew M.** The distribution of β -lactamase genes on plasmids found in *Pseudomonas*. *Plasmid* 1979; 2:41-47.

- 283.- Heffron F, Kostriken R, Moirita C, Parker R. Tn3 encodes a site-specific recombination system: Identification of essential sequences, genes, and the actual site of recombination. Cold Spring Harbor Symp, Quant, Biol 1981; 45:259-268.
- 284.- Casadaban MJ, Chou J, Lemaux P, Tu CP, Cohen SN. Tn3: Transposition and control. Cold Spring Harbor Symp, Quant, Biol 1981; 45:269-273.
- 285.- Chen ST, Clowes RC. Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD 131, pJB1, pFA3, and pFA7 and beta-lactamase expression in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 1987; 169: 3124-3130.
- 286.- Sykes RB, Matthew M. Detection, assay and immunology of beta-lactamases. In: JMT Hamilton-Miller, JT Smith (Eds), Beta-lactamases. Academic Press, London. pp:17-49. 1979.
- 287.- Cooksey RC, Clark NC, Thornsberry C. A gene probe for TEM type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28:154-156.
- 288.- Ouellette M, Rossi JJ, Bazin R, Roy PH. Oligonucleotide probes for the detection of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamase genes and their transposons. Can J Microbiol 1987; 33:205-211.
- 289.- Nugent ME, Hedges RW. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase from plasmid. Mol Gen Genet 1979; 175:239-243.
- 290.- Medeiros AA, Cohenford M, Jacoby GA. Five novel plasmid-determined beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27:715-719.
- 291.- Yang YJ, Jacoby GA, Livermore DM. LXA-1: a new plasmid-mediated β -lactamase giving low level resistance. FEMS Microbiol Lett 1988; 52:97-102.
- 292.- Rubin LG, Medeiros AA, Yolken RH, Moxon ER. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type B meningitis due to novel beta-lactamase. Lancet 1981; II:1008-1010.
- 293.- Medeiros AA, Levesque R, Jacoby GA. An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29:212-215.
- 294.- Joly B, Delmas C, Rich C, Prere MF, Livrelli V, Dabernat H. Un nouveau mécanisme de résistance à l'ampicilline par production de beta-lactamase ROB-1 chez une souche d' *Haemophilus influenzae* isolée en France. Presse Méd 1987; 16:916-917.
- 295.- Simpson IN, Plested SJ, Budin-Jones MJ, Lees J, Hedges RW, Jacoby GA. Characterization of a novel plasmid-mediated beta-lactamase and its contribution to beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 1983; 19:23-27.
- 296.- Levesque RC, Jacoby GA. Molecular structure and interrelationships of multiresistance beta-lactamase transposons. Plasmid 1988; 19:21-29.

-
- 297.- **Livermore DM, Jones CS.** Characterization of NPS-1, a novel plasmid-mediated β -lactamase from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:99-103.
- 298.- **Paul G, Philippon A, Nevot P.** Immunological identification of beta-lactamases: specificity of an immune serum anti-OXA-2. *Chemioterapia* 1985; 4:31-33.
- 299.- **Philippon AM, Paul GC, Jacoby GA.** New plasmid-mediated oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17:415-422.
- 300.- **Dale JW, Goodwin D, Mossakowska D, Stephenson P, Wall S.** Sequence of the OXA-2 beta-lactamase: comparison with other penicillin-reactive enzymes. *FEBS Lett* 1985; 191:39-44.
- 301.- **Yamamoto T, Tanaka M, Nohara C, Fukunaga Y, Yamagishi S.** Transposition of the oxacillin-hydrolyzing penicillinase gene. *J Bacteriol* 1981; 145:808-813.
- 302.- **Simpson I, Plested SJ, Harper PB.** Investigation of the beta-lactamase stability of ceftazidime and eight other new cephalosporin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1982; 9:357-368.
- 303.- **Matthew M, Sykes RB.** Properties of the beta-lactamase specified by the *Pseudomonas* plasmid RPL11. *J Bacteriol* 1977; 132:341-345.
- 304.- **Iabia R, Guionie M, Barthelemy M, Philippon A.** Properties of three carbenicillin hydrolyzing beta-lactamases (CARB) from *Pseudomonas aeruginosa*: Identification a new enzyme. *J Antimicrob Chemother* 1981; 7:49-56.
- 305.- **Livermore D, Maskell JP, and Williams JD.** Detection of PSE (*Pseudomonas*-specific enzyme)-2 β -lactamase in *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:268-272.
- 306.- **Katsu K, Inoue M, Mitsuhashi S.** Plasmid-mediated carbenicillin hydrolyzing beta-lactamases of *Proteus mirabilis*. *J Antibiot* 1981; 43:1504-1506.
- 307.- **Medeiros AA, Hedges RW, Jacoby GA.** Spread of a "Pseudomonas-specific" beta-lactamases to plasmids of enterobacteria. *J Bacteriol* 1982; 149:700-707.
- 308.- **Philippon AM, Paul GC, Jacoby GA.** Properties of PSE-2 beta-lactamase and genetic basis for its production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24:362-369.
- 309.- **Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R.** Plasmid-determined beta-lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12:507-510.
- 310.- **Philippon AM, Paul GC, Thabaut AP, Jacoby GA.** Properties of a novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-4) specified by an IncP-2 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:519-520.

-
- 311.- Hedges RW, Medeiros AA, Cohenford M, Jacoby GA. Genetic and biochemical properties of AER-1, a novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27:479-484.
- 312.- Reid AJ, Amyes SGB. Plasmid penicillin resistance in *Vibrio cholerae*: identification of new beta-lactamase SAR-1. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30:245-247.
- 313.- Eliasson I, Kamme C. Characterization of the plasmid-mediated beta-lactamase in *Branhamella catarrhalis*, with special reference to substrate affinity. J Antimicrob Chemother 1985; 15:139-149
- 314.- Bobrowski MM, Matthew M, Barth PT, et al. Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1976; 125: 149-157.
- 315.- Levesque R, Roy PH, Letarte R, Pechere JC. A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. J Infect Dis 1982; 145:753-761.
- 316.- Livermore DM, Moosdeen F, Lindridge MA, Ko P, Williams JD. Behaviour of TEM-1 beta-lactamase as a resistance mechanism to ampicillin, mezlocillin and azlocillin in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 1986; 17:139-146.
- 317.- Marre R, Borner K, Schulz E. Different mechanisms of TEM-1 and OXA-1 mediated resistance to piperacillin in *E. coli*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg 1984; 58:287-295.
- 318.- Simpson IN, Knoth H, Plested SJ, Harper PB. Qualitative and quantitative aspects of beta-lactamase production as mechanisms of beta-lactam resistance in a survey of clinical isolates from faecal samples. J Antimicrob Chemother 1986; 17:725-737.
- 319.- Jacoby GA, Sutton L. Beta-lactamases and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents Chemother 1985; 28:703-705.
- 320.- Medeiros AA, O'Brien TF. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type beta-lactamase but little permeability barrier to ampicillin. Lancet I:716. 1975.
- 321.- Medeiros AA, Kent RL, O'Brien TF. Characterization and prevalence of the different mechanisms of resistance to beta-lactam in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6:791-801.
- 322.- Jouvenot M, Bonin P, Michel-Briand Y. Frequency of beta-lactamases that are markedly active against carbenicillin in the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in a Medical School Hospital. J Antimicrob Chemother 1983; 12:451-458.
- 323.- Philippon A, Thabaut A, Meyran M, Nevot P. Distribution des beta-lactamases constitutives chez *Pseudomonas aeruginosa*. Presse Méd 1984; 13:772-776.

- 324.- Roy C, Segura C, Tirado M, et al. Frequency of plasmid-determined beta-lactamases in 680 consecutively isolated strains of *Enterobacteriaceae*. Eur J Clin Microbiol 1985; 4:146-147.
- 325.- Simpson IN, Harper PB, O'Callaghan CH. Principal beta-lactamases responsible for resistance to beta-lactam antibiotics in urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17:929-936.
- 326.- Thabaut A, Philippon A, Meyran P. Beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and susceptibility against beta-lactam antibiotics. Chemioterapia 1985; IV:36-42.
- 327.- Tirado M, Roy C, Segura C, Reig R, Hermida M, Poz A. Incidence of strains producing plasmid determined beta-lactamases among carbenicillin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1986; 18:453-458.
- 328.- Whitaker S, Hajipieris P, Williams JD. Distribution and type of beta-lactamase amongst 1000 gram-negative rod bacteria. Proc 13th Int Congr Chemother 1983; 89:10-11.
- 329.- Williams RJ, Livermore DM, Lindridge MA, Said AA, Williams JD. Mechanisms of beta-lactam resistance in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1984; 17:283-293.
- 330.- Thatcher DR. Progress on penicillinase. Nature 1975; 255: 526.
- 331.- Hall A, Knowles JR. Directed selective pressure on a β -lactamase to analyse molecular changes involved in development of enzyme function. Nature (London) 1976; 264:803-804.
- 332.- Bush K. Excitement in the β -lactamase arena. J. Antimicrob Chemother 1989; 24:831-836.
- 333.- Shah PM, Stille W. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1983; 11:597-601.
- 334.- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11:315-317.
- 335.- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to novel β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility. Rev Infect Dis 1988; 10:867-878.
- 336.- Bure A, Legrand P, Arlet G, Jarlier V, Paul G, Philippon A. Dissemination in five french hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7:780-783.

- 337.- Gutmann L, Ferre B, Goldstein FW, et al. SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:951-956.
- 338.- Sirot D, Sirot J, Labia R, et al. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1 a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 323-334.
- 339.- Brun-Buisson C, Philippon A, Ansquer M, Legrand P, Montravers F, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2:302-306.
- 340.- Sanders CC. β -lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1089-1099.
- 341.- Bauerfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17:316-321.
- 342.- Bauerfeind A, Schweighart S, Dornbusch K, Giamarellou H. A transferable cephamycinase (CMY-ase) in *Klebsiella pneumoniae* (K. pn). Abstract n^o 190. ICAAC, Atlanta 1990.
- 343.- Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2200-2209.
- 344.- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-151.
- 345.- Huletsky A, Couture F, Levesque RC. Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1725-1732.
- 346.- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis* 1988; 10:879-884.
- 347.- Peduzzi J, Barthelemy M, Tiwari K, Mattioni D, Labia R. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 2160-2163.
- 348.- Labia R, Morand A, Tiwari K, Sirot J, Sirot D, Petit A. Interactions of new plasmid-mediated β -lactamases with third-generation cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988; 10:885-891.
- 349.- Sougakoff W, Petit A, Goussard S, Sirot D, Bure A, Courvalin P. Characterization of the plasmid genes blaT-4 and blaT-5 which encode the broad-spectrum β -lactamases TEM-4 and TEM-5 in *Enterobacteriaceae*. *Gene* 1989; 78: 339-348.

- 350.- Garbarg-Chenon A, Godard V, Labia R, Nicolas JC. Nucleotide sequence of SHV-2 β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1444-1446.
- 351.- Nicolas MH, Jarlier V, Honore N, Philippon A, Cole ST. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 β -lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:2096-2100.
- 352.- Billot-Klein D, Gutmann L, Collatz E. Nucleotide sequence of the SHV-5 β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2439-2441.
- 353.- Labia R, Morand A, Tiwari K, Pitton JS, Sirot D, Sirot J. Kinetic properties of two plasmid-mediated β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* with strong activity against third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21:301-307.
- 354.- Bush K, Singer SB. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. *Infection* 1989; 17:429-433.
- 355.- Jacoby G, Carreras I. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:854-862.
- 356.- Jacoby G, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:164-169.
- 357.- Philippon A, Ben Redjeb, Fournier G, Ben Hassen A. Epidemiology of extended spectrum β -lactamases. *Infection* 1989; 17:347-354.
- 358.- Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis* 1988; 10:850-859.
- 359.- Petit A, Gerbaud G, Sirot D, Courvalin P, Sirot J. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:219-224.
- 360.- Ben Redjed S, Ben Yaghlane H, Boujnah A, Philippon A, Labia R. Synergy between clavulanic acid and newer β -lactams on nine clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* resistant to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1990; 32: 9-14.
- 361.- Rossi MA, Gutkind G, Quinteros M, et al. A *Proteus mirabilis* with a novel extended spectrum betalactamases and six different aminoglycoside resistance genes. Abstract no 939. 31th ICAAC, Chicago. 1991
- 362.- Watanabe I, Yakota T, Higashi Y, Wakai Y, Mine Y. In vitro and in vivo transferable β -lactam resistance to a new plasmid mediated oximinoccephalosporinase from a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Microbiol Immunol* 1991; 35:87-97.

- 363.- Woodford N, Payne DJ, Johnson AP, et al. Transferable cephalosporin resistance not inhibited by clavulanate in *Escherichia coli*. Lancet 1990; 336:253.
- 364.- Yang Y, Wu P, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:755-758.
- 365.- Smith CE, Tillman S, Howell AW, Longfield RN, Jorgensen JH. Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:1290-1293.
- 366.- Payne DJ, Amyes SGB. Transferable resistance to extended-spectrum β -lactams: a major threat or a minor inconvenience?. J Antimicrob Chemother 1991; 27:255-261.
- 367.- Martínez-Beltrán J, Negri C, Morosini MI, et al. Acquisition of a new plasmid-mediated β -lactamase in an intrahospitalary *Salmonella arizonae* outbreak. Abstract n° 185, 30th ICAAC. Atlanta, 1990.
- 368.- Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein FW, et al. Dissemination of the novel plasmid-mediated β -lactamase CTX-1 which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins and its inhibition by β -lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:9-14.
- 369.- Arlet G, Sanson-le Pors MJ, Rouveau M, et al. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing beta-lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:797-803.
- 370.- Paul GC, Gerbaud G, Bure A, Philippon AM, Pangen B, Courvalin P. TEM-4, a new plasmid-mediated β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1958-1963.
- 371.- Petit A, Sirot DL, Chanal CM, et al. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:626-630.
- 372.- Bauerfeind A, Horl G. Novel R-factor borne β -lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. Infection 1987; 15:257-259.
- 373.- Mabilat C, Legrand P, Duval J, Courvalin P. Analyse de la sequence nucleotidique du gene blaT-8 codant la β -lactamase a spectre elargi TEM-8. Abstract n° 136/P12. RICA, Paris 1989.
- 374.- Vuye A, Verschraegen, Claeys G. Plasmid-mediated β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to ceftazidime. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:757-761.
- 375.- Weber DA, Sanders CC, Bakken JS, Quinn JP. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance. J Infect Dis 1990; 162:460-465.

-
- 376.- Chanal CM, Sirot DL, Labia R, et al. Comparative study of a novel plasmid-mediated β -lactamase, CAZ-2, and the CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1660-1665.
- 377.- Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of two novel TEM-derivative ceftazidimases, CAZ-6 and CAZ-7, from *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24:86-87.
- 378.- Chanal CM, Sirot DL, Petit A, et al. Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1915-1920.
- 379.- Rice LR, Willey SH, Papanicolaou A, et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2193-2199.
- 380.- Gutmann L, Kitzis MD, Billot-Klein D, et al. Plasmid-mediated β -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. *Rev Infect Dis* 1988; 10:860-866.
- 381.- Spencer RC, Wheat PF, Winstanley TG, Cox DM, Plested SJ. Novel β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20:919-927.
- 382.- Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1989; 33:1451-1456.
- 383.- Payne DJ, Marriott MS, Amyes SGB. Mutants of the TEM-1 β -lactamase conferring resistance to ceftazidime. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24:103-110.
- 384.- Deschaseaux ML, Jouvenot M, Adessi GL, Michel-Briand Y. Two presumed novel β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21:133-142.
- 385.- Richmond MH. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two side of a continuing story. *Rev Infect Dis* 1979; 1:30-36.
- 386.- Sanders CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41:573-593.
- 387.- Sanders CC, Sanders WE Jr. Clinical importance of inducible beta-lactamases in gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:435-437.
- 388.- Knott-Hunziker V, Petursson S, Jayatilake GS, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. Active sites of β -lactamases: the chromosomal β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Biochem J* 1982; 201:621-627.

-
- 389.- Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin SG, Grundstrom T. The acyl-enzyme mechanism of β -lactamase action. *Biochem J* 1982; 207:315-322.
- 390.- Bush K, Sykes RB. Interaction of β -lactam antibiotics with β -lactamases as a causa for resistance. In: LE Bryan (ed), *Antimicrobial Drug Resistance*. Academic Press, New York. pp:1-31. 1984.
- 391.- Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Induction of chromosomal beta-lactamase expression in enterobacteria. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18 Suppl C):43-50.
- 392.- Normark S, Lindquist S, Lindberg F. Chromosomal beta-lactam resistance in *Enterobacteria*. *Scand J Infect Dis (Suppl)* 49 1986 :38-45.
- 393.- Jiménez-Lucho VE, Saravolatz LD, Medeiros AA, Pohlod D. Failure of therapy in *Pseudomonas* endocarditis: selection of resistant mutants. *J Infect Dis* 1986; 154:64-68.
- 394.- Phillips I, Shannon K. The emergence of resistance and the therapy of septicaemia. *Chemioterapia* 1985; 4:90-94.
- 395.- Vuthien H, Rolland M. *Citrobacter freundii*: in vivo emergence of a mutant resistant to beta-lactam antibiotics during therapy with ceftazidime. *Presse Med* 1986; 15:1241-1242.
- 396.- Weinstein RA. Occurrence of cefotaxime-resistant *Enterobacter* during therapy of cardiac surgery patients. *Chemioterapia* 1985; 4:110-112.
- 397.- Sanders CC. Inducible β -lactamases and non-hydrolytic resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13:1-3.
- 398.- Gutmann J, Williamson R. A model system to demonstrate that β -lactamase-associated antibiotic trapping could be a potential means of resistance. *J Infect Dis* 1983; 8:316-321.
- 399.- Then RL, Angehrn P. Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21:711-717.
- 400.- Livermore DM, Riddle SJ, Davy KWM. Hydrolytic model for cefotaxime and ceftriaxone resistance in β -lactamase-derepressed *Enterobacter cloacae*. *J Infect Dis* 1986; 153:619-622.
- 401.- Livermore DM, Williams JD, Davy KWM. Cephalosporin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, with special reference to the proposed trapping of antibiotics by beta-lactamase. *Chemioterapia* 1985; 4:28-35.
- 402.- White AJ, Curtis NA. Hydrolysis of β -lactamase-stable β -lactams by type I "sponge" β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16:403-405.
- 403.- Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark S. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 1981; 290: 221-225.

-
- 404.- Bergstrom S, Normark S. β -lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of ampC-mediated chromosomal beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16:427-433.
- 405.- Edlund T, Grundström T, Normark S. Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal β -lactamase gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 1979; 173:115-125.
- 406.- Kabins SA, Sweeney BM, Cohen S. Resistance to cephalothin in vivo associated with increased cephalosporinase production. *Ann Intern Med* 1966; 65:1271-1277.
- 407.- Olsson O, Bergström S. AmpC β -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:7556-7560.
- 408.- Normark S, Edlund T, Grundström T, Bergström S, Wolf-Watz H. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions. *J Bacteriol* 1977; 132:912-922.
- 409.- Takahashi I, Sawai T, Ando T, Yamagishi S. Cefoxitin resistance by a chromosomal cephalosporinase in *Escherichia coli*. *J Antibiot* 1980; 33:1037-1042.
- 410.- Gootz TD, Sanders CC. Characterization of β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:91-97.
- 411.- Minami S, Matsubara N, Yotsuji A, et al. Induction of cephalosporinase production by various penicillins in *Enterobacteriaceae*. *J Antibiot* 1983; 36:1387-1395.
- 412.- Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S. Induction of β -lactamase by various β -lactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:382-385.
- 413.- Moosdeen F, Keeble J, Williams JD. Induction/inhibition of chromosomal β -lactamases by β -lactamase inhibitors. *Rev Infect Dis* 1986; 8(Suppl 5): S562-568.
- 414.- Okonogi K, Sugiura A, Kuno M, Higashide E, Kondo M, Imada A. Effect of β -lactamase induction on susceptibility to cephalosporins in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16:31-42.
- 415.- Aronoff SC, Shales DM. Factors that influence the evolution of β -lactam resistance in β -lactamase inducible strains of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987; 155:936-941.
- 416.- Minami S, Inoue S, Mitsuhashi S. Purification and properties of a cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:853-857.

-
- 417.- Nordström K, Sykes RB. Induction kinetics of beta-lactamase biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6:734-740.
- 418.- Sanders CC, Sanders WE Jr, Goering RV. Influence of clindamycin on de-repression of beta-lactamases in *Enterobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24:48-53.
- 419.- Jacobs JY, Livermore DM, Davy KWM. *Pseudomonas aeruginosa* β -lactamase as a defense against azlocillin, mezlocillin and piperacillin. J Antimicrob Chemother 1984; 14:221-229.
- 420.- Tausk F, Evans ME, Patterson LS, Federspiel CF, Stratton CW. Imipenem-induced resistance to antipseudomonal β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28:41-45.
- 421.- Livermore DM, Yang Y-J. β -lactamase lability and inducer power of newer β -lactam antibiotics in relation to their activity against β -lactamase-inducibility mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 1987; 155:775-782.
- 422.- Curtis NAC, East SJ, Cornford RJ, Walker LA. Properties of spontaneous *Enterobacter cloacae* mutants with temperature-conditional derepression of type I β -lactamase synthesis. J Antimicrob Chemother 1987; 19:417-428.
- 423.- Korfmann G, Sanders CC. AmpG is essential for high-level expression of AmpC β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. Antimicrobial Agents Chemother 1989; 33:1946-1951.
- 424.- Lodge JM, Piddock LJV. The control of class I β -lactamase expression in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1991; 28:167-172.
- 425.- Gates ML, Sanders CC, Goering RV, Sanders WE Jr. Evidence for multiple forms of type I chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 30:453-457.
- 426.- Gootz TD, Jackson DB, Sherris JC. Development of resistance to cephalosporins in clinical strains of *Citrobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 1984; 25:591-595.
- 427.- Gootz TD, Sanders CC, Goering RV. Resistance to cefamandole: derepression of β -lactamases by cefoxitin and mutation in *Enterobacter cloacae*. J Infect Dis 1982; 146:34-42.
- 428.- Lampe MF, Allan BJ, Minshew BH, Sherris JC. Mutational enzymatic resistance of *Enterobacter* species to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1982; 21:655-660.
- 429.- Findell CM, Sherris JC. Susceptibility of *Enterobacter* to cefamandole: evidence for a high mutation rate to resistance. Antimicrob Agents Chemother 1976; 9:970-974.

- 430.- del Rosario Valencia AM, Vuye A, Pijck J. Selection of resistant mutants of *Citrobacter freundii* by second and third generation cephalosporins and imipenem. *Infection* 1984; 12:402-404.
- 431.- Büscher K-H, Cullmann W, Stieglitz M. Selection frequency of resistant variants by various β -lactam antibiotics in clinical *Enterobacter cloacae* isolates. *Chemotherapy* 1987; 33:40-51.
- 432.- Cullmann W, Büscher KH, Dick W. Selection and properties of *Pseudomonas aeruginosa* variants resistant to beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:467-473.
- 433.- Ashby J, Kirkpatrick B, Piddock LJV, Wise R. The effect of imipenem on strains of *Enterobacteriaceae* expressing Richmond and Sykes class I β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20:15-22.
- 434.- Bryan LE, Kwan S, Godfrey AJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* mutants with altered control of chromosomal β -lactamase to piperacillin, ceftazidime, and cefsulodin. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25:382-384.
- 435.- Sanders CC, Moellering RC Jr, Martin RR, et al. Resistance to cefamandole: a collaborative study of emerging clinical problems. *J Infect Dis* 1982; 145:118-125.
- 436.- Berks M, Redhead K, Abraham EP. Isolation and properties of an inducible and a constitutive β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 1982; 128:155-159.
- 437.- Gwynn MN, Rolinson GN. Selection of variants of gram-negative bacteria with elevated production of type I β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11:577-581.
- 438.- Livermore DM, Williams RJ, Lindridge MA, Slack RCB, Williams JD. *Pseudomonas aeruginosa* isolates with modified β -lactamase inducibility: effects on β -lactam sensitivity. *Lancet* 1982; 1: 1466-1467.
- 439.- Sanders CC, Sanders WE Jr. Trapping and hydrolysis are not mutually exclusive mechanisms for β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 1986a; 17:121-122.
- 440.- Livermore DM. "Covalent trapping" and latamoxef resistance in β -lactamase-derepressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1987; 20:7-13.
- 441.- Murakami K, Yoshida T. Covalent binding of moxalactam to cephalosporinase of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:727-732.
- 442.- Burman LG, Park JR, Lindstrom EB, Boman HG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. *J Bacteriol* 1973; 116:123-130.
- 443.- Bachmann BJ. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 7. *Microbiol Rev* 1983; 47:180-230.

-
- 444.- Eriksson-Grennberg KG, Boman HG, Jansson JAT, Thoren S. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. I. Genetic study of some ampicillin-resistant mutants. *J Bacteriol* 1965; 90:54-62.
- 445.- Eriksson-Grennberg KG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. II. An improved mapping of the ampA gene. *Genet Res* 1968; 12:147-156.
- 446.- Lindstrom EB, Boman HG, Steele BB. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in ampA-containing strains. *J Bacteriol* 1970; 101:218-231.
- 447.- Nordstrom K, Eriksson-Grennberg KG, Bowman HG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. III. ampB, a locus affecting episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and chloramphenicol. *Genet Res* 1968; 12:157-168.
- 448.- Grundstrom T, Jaurin B, Edlund T, Normark S. Physical mapping and expression of hybrid plasmids carrying chromosomal beta-lactamase genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1980; 143:1127-1134.
- 449.- Grundstrom T, Jaurin B. Overlap between ampC and frd operons on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:1111-1115.
- 450.- Kobayashi S, Arai S, Hayashi S, Kujimoto K. β -lactamase stability of cefpirome (HR 810), a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30:713-718.
- 451.- Sawai T, Kanno M, Tsukamoto K. Characterization of eight beta-lactamases of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1982; 152:267-271.
- 452.- Guerin S, Paradis F, Guay R. Cloning and characterization of chromosomally encoded cephalosporinase gene of *Enterobacter cloacae*. *Can J Microbiol* 1985; 32:301-309.
- 453.- Hennessey TD, Richmond MH. The purification and some properties of a β -lactamase (cephalosporinase) synthesized by *Enterobacter cloacae*. *Biochem J* 1968; 109:469-473.
- 454.- Marshall MJ, Ross GW, Chanter KV, Harris AM. Comparison of the substrate specificities of the β -lactamases from *Klebsiella aerogenes* 1082E and *Enterobacter cloacae* P99. *Appl Microbiol* 1972; 23:765-769.
- 455.- Seeberg AH, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Chromosomal β -lactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third generation cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:918-925.
- 456.- Tajima M, Takenouchi Y, Sugawara S, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of chromosomally mediated β -lactamase from *Citrobacter freundii* GN7391. *J Gen Microbiol* 1980; 121:449-456.
- 457.- Lindberg F, Normark S. Sequence of the *Citrobacter freundii* OS60 chromosomal ampC β -lactamase gene. *Eur J Biochem* 1986; 156:441-445.

-
- 458.- Farrar WE Jr, O'Dell NM. β -lactamases and resistance to penicillins and cephalosporins in *Serratia marcescens*. J Infect Dis 1976; 134:245-251.
- 459.- Joris B, DeMeester F, Galleni M, et al. Properties of a class C β -lactamase from *Serratia marcescens*. Biochem J 1986; 239:581-586.
- 460.- Tajima M, Masuyoshi S, Inoue M, Takenouchi Y, Sugawara S, Mitsuhashi S. Purification and properties of β -lactamases from *Serratia marcescens*. J Gen Microbiol 1981;126:179-184.
- 461.- Fujii-Kuriyama Y, Yamamoto M, Sugawara S. Purification and properties of beta-lactamase from *Proteus morgani*. J Bacteriol 1977; 131:726-734.
- 462.- Matsuura M, Nakazawa H, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and biochemical properties of β -lactamase produced by *Proteus rettgeri*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18:687-690.
- 463.- Ohya S, Fujii-Kuriyama Y, Yamamoto M, Sugawara S. Purification and some properties of β -lactamases from *Proteus rettgeri* and *Proteus inconstans*. Microbiol Immunol 1980; 24:815-824.
- 464.- Murata T, Minami S, Yasuda K, et al. Purification and properties of cephalosporinase from *Pseudomonas aeruginosa*. J Antibiot 1981; 34:1164-1170.
- 465.- Normark S, Bartwsky E, Lindquist S, et al. The molecular basis of β -lactamase induction in enterobacteria. In: HC Neu (Ed). New Bacterial Strategies. Curchill Livingstone, Edimburgh. pp:161-173. 1990.
- 466.- Honore N, Nicolas M-H, Cole ST. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J 1986; 5:3709-3714.
- 467.- Korfmann G, Wiedemann B. Genetic control of β -lactamase production in *Enterobacter cloacae*. Rev Infect Dis 1988; 10:793-799.
- 468.- Lindberg F, Normark S. Common mechanism of AmpC β -lactamase induction in enterobacteria: regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99 β -lactamase gene. J Bacteriol 1987; 169:758-763.
- 469.- Lindberg F, Westman L, Normark S. Regulatory components in *Citrobacter freundii* ampC β -lactamase induction. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:4620-4624.
- 470.- Lindberg S, Lindberg F, Normark S. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA binding site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC β -lactamase gene. J Bacteriol 1989; 171:3746-3753.
- 471.- Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Inactivation of ampD causes semi-constitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. J Bacteriol 1987; 169:1923-1928.

- 472.- Nicolas M-H, Honore N, Jarlier V, Philippon A, Cole ST. Molecular genetic analysis of cephalosporinase production and its role in β -lactam resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:295-299.
- 473.- Fleming PC, Goldner M, Glass DG. Observations on nature, distribution and significance of cephalosporinase. Lancet 1963; 1:1399.
- 474.- Hennessey TD. Inducible β -lactamase in *Enterobacter*. J Gen Microbiol 1967; 49:277-285.
- 475.- Livermore DM. Beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1982; 10:168-171.
- 476.- Sabath LD, Abraham EP. Synergistic action of penicillins and cephalosporins against *Pseudomonas pyocyanea*. Nature 1964; 204:1066-1069.
- 477.- Sabath LD, Jago M, Abraham EP. Cephalosporinase and penicillinase activities of a beta-lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. Biochem 1965; 96: 739-752.
- 478.- Matsumoto H, Terawaki Y. Chromosomal location of the genes participating in the formation of beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Symposium on Microbial Drug Resistance, Tokyo, p 207. 1981.
- 479.- Livermore DM. Kinetics and significance of the activity of the Sabath and Abrahams' β -lactamase of *Pseudomonas aeruginosa* against cefotaxime and cefsulodin. J Antimicrob Chemother 1983; 11:169-179.
- 480.- Bell SM, Pham JN, Langarone JYM. Mutation of *Pseudomonas aeruginosa* to piperacillin resistance mediated by beta-lactamase production. J Antimicrob Chemother 1985; 15:665-670.
- 481.- King A, Shannon K, Eykyn S, Phillips I. Reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics arising during ceftazidime treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Antimicrob Chemother 1983; 12:363-370.
- 482.- Nichols L, Maki DG. The emergence of resistance to beta-lactam antibiotics during treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lower respiratory tract infections: is combination therapy the solution?. Chemioterapia 1985; 4:102-109.
- 483.- Pechere JC, Guay R, Dubois J, Letarte R. Hydrolysis of cefotaxime by a beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17:1001-1003.
- 484.- Sato K, Inoue M, Mitsunashi S. Activity of β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis* against newly introduced cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17:736-737.
- 485.- Hirai K, Sato K, Katsumata R, Inoue M, Mitsunashi S. Immunological properties of beta-lactamases that hydrolyze cefuroxime and cefotaxime. Antimicrob Agents Chemother 1981; 20:262-264.

-
- 486.- Matsubara N, Yotsuji A, Kumanu K, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and some properties of a cephalosporinase from *Proteus vulgaris*. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19:185-187.
- 487.- Okonogi K, Kuno M, Higashide E. Induction of β -lactamase in *Proteus vulgaris*. J Gen Microbiol 1986; 132:143-150.
- 488.- Tajima M, Takenouchi Y, Ohya S, Sugawara S. Purification and properties of β -lactamase from *Proteus vulgaris*. Microbiol Immunol 1982; 26:531-534.
- 489.- Grace ME, Gregory FJ, Fu KP. Purification and properties of a β -lactamase from *Proteus penneri*. J Antibiot (Tokyo) 1986; 39:938-942.
- 490.- Hirai K, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of a new β -lactamase from *Pseudomonas cepacia*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17:355-358.
- 491.- Livermore DM, Chau PY, Wong AIW, Leung PK. β -lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 1987; 20:313-321.
- 492.- Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22:564-570.
- 493.- Saino Y, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN 12873. Antimicrob Agents Chemother 1984; 25:362-365.
- 494.- Fujii T, Sato K, Inoue M, Mitsuhasi S. Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Alkaligenes faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27:608-611.
- 495.- Hamilton-Miller JMT. Penicillinase from *Klebsiella aerogenes*. A comparison with penicillinase from gram-positive species. Biochem J 1963; 87:209-214.
- 496.- Sawai T, Yamagishi S, Mitsuhashi S. Penicillinases of *Klebsiella pneumoniae* and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R factors. J Bacteriol 1973; 115:1045-1054.
- 497.- Joris B, DeMeester F, Galleni M, Freere JM, VanBeeumen J. The K1 β -lactamase of *Klebsiella pneumoniae*. Biochem J 1987; 243:561-567.
- 498.- Hart CA, Percival A. Resistance to cephalosporins among gentamicin-resistant klebsiellae. J Antimicrob Chemother 1982; 9:275-286.
- 499.- Inoue M, Haller I, Mitsuhasi S. Purification and properties of chromosomally mediated betalactamases from *Klebsiella oxytoca*. In: KH Spitzzy, K Karrer (Eds). Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy. 51:21-24. 1983.

-
- 500.- Labia R, Morand A, Guionie M, Heitz M, Pitton JS. Betalactamases de - *Klebsiella oxytoca*; Etude de leur action sur les cephalosporines de troisieme generation. Pathol Biol (Paris) 1986; 34:611-615.
- 501.- Shannon K, King A, Phillips I. Development of resistance to β -lactam antibiotics during therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Lancet 1982; 1:1466.
- 502.- Beckwith DG, Jahre JA. Role of a cefoxitin inducible beta-lactamase in a case of breakthrough bacteremia. J Clinical Microbiology 1980; 12:517-520.
- 503.- Olson B, Weinstein RA, Nathan C, Kabins SA. Broad spectrum β -lactam resistance in *Enterobacter*: emergence during treatment and mechanism of resistance. J Antimicrobial Chemotherapy 1983; 11:299-310.
- 504.- Scully BE, Neu HC. The use of ceftizoxime in the treatment of critically-ill patients infected with multiply antibiotic resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 1982; Suppl C 10:141-150.
- 505.- Paull A, Morgan JR. Emergence of ceftriaxone-resistant strains of - *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. J Antimicro Chemother 1986; 18:635-639.
- 506.- Weinbren MJ, Perinpanayagam RM. Test for β -lactamase production. Lancet 1985; ii 673-674.
- 507.- Bouza E, Hellín T, Sanz Hospital J, Rodriguez-Creixems M, Loza E, Martínez-Beltrán J. Evaluation of ceftazidime in the treatment of moderate and severe infection. J Antimicrob Chemother 1983; 12(Suppl A):153-159.
- 508.- Preheim LC, Penn RG, Sanders CC, Goering RV, Giger DK. Emergence of resistance to β -lactam and aminoglycoside antibiotics during moxalactam therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22:1037-1041.
- 509.- Kirkpatrick B, Ashby J, Wise R. β -lactams and imipenem. Lancet 1986; i:802.
- 510.- Edwards PR, Edwing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3th Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 1972.
- 511.- Hugh R, Gilardi GL. *Pseudomonas*. In: EH Lennette, EH Spaulding, JP Truant (Eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:250-269. 1974.
- 512.- Martin WJ, Washington II JA. *Enterobacteriaceae*. In: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler Jr, JP Truant (Eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:195-219. 1980.
- 513.- Hugh R, Gilardi GL. *Pseudomonas*. In: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler Jr, JP Truant (Eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:288-317. 1980.

- 514.- **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard ASM-2. NCCLS, Villanova PA. 1975.
- 515.- **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A2. NCCLS, Villanova PA. 1979.
- 516.- **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A3. NCCLS, Villanova PA. 1984.
- 517.- **Washington II JA, Barry AL.** Dilution test procedures. In: EH Lennette, EH Spaulding, JP Truant (Eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:410-417. 1974.
- 518.- **Washington II JA, Sutter VL.** Dilution test procedures: agar and macro-broth dilution procedures. In: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler Jr, JP Truant (Eds). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:453-458. 1980.
- 519.- **National Committee for Clinical Laboratory Standards:** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A. NCCLS, Villanova PA. 1985.
- 520.- **Sokal R, Rohlf F.** Biometría: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Editorial Blume. Madrid. 1979.
- 521.- **Carrasco JL.** El método estadístico en la investigación médica. Editorial Ciencia 3. Madrid. 1991.
- 522.- **Jenkins SG.** Approaches to antibiograms and formulary-based antibiotic reporting. Clin Microbiol Newsletter 1990; 12:30-32.
- 523.- **Chapin-Robertson K, Edberg SC.** Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: V Lorian (Ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore. pp:295-366. 1991.
- 524.- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-275.
- 525.- **Wiedemann B, Kliebe C, Kresken M.** The epidemiology of β -lactamases. J Antimicrob Chemother 1989; 24 Suppl B:1-22.
- 526.- **Martínez-Beltrán J, Loza E, Bautista MJ, et al.** Gram-negative bacteraemia 1988-1990: Distribution and antibiotic sensitivity profiles. Abstract N^o 1612, 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Oslo, 1991.
- 527.- **Finland M.** Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. Rev Inf Dis 1979; 1:4-21.

- 528.- O'Brien T, and the International Survey of Antibiotic Resistance Group. Resistance to antibiotics at medical centres in different parts of the world. J Antimicrob Chemother 1986; 18 Suppl C:243-253.
- 529.- O'Brien T, and the Members of Task Force 2. Resistance of bacteria to antibacterial agents: Report of Task Force 2. Rev Inf Dis 1987; 9 Suppl 3: 244-261.
- 530.- Wiedemann B, Atkinson BA. Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. In: V Lorian (Ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 962-1208; 1991.
- 531.- Martínez-Beltrán J, Papa E, Loza E, Cantón R, Medeiros AA. Decreased susceptibility to 3rd generation cephalosporins and monobactams in *Escherichia coli* hyperproducing OXA-1 and chromosomal class I β -lactamases. Abstract N^o 112, 5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Oslo, 1991.
- 532.- Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, et al. Resistance to cefotaxime and seven other β -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1677-1681.
- 533.- Medeiros AA, Kent RL, O'Brien T. Characterization and prevalence of the different mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6:791-801.
- 534.- Roupas A, Pitton JS. R-factor mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 5:186-191.
- 535.- Sogaard P. Resistance types in *Escherichia coli*. I Occurrence and resistance to ampicillin, carbenicillin and cephalothin. Acta Path Microbiol Scand Sect B 1979; 87:235-241.
- 536.- Sogaard P. Resistance types in *Escherichia coli*. Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B 1983; 51:49-54.
- 537.- Martínez-Beltrán J. Fenotipos de sensibilidad en *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. En: Conferencia Internacional sobre Beta-lactamasas. Laboratorios Beecham SA, Madrid. pp 123-128, 1982.
- 538.- Jarlier V, Bismuth R, Nicolas MH, Nguyen J, Truffot C, Grosset J. Survey of the phenotypes of susceptibility to β -lactams in *Enterobacteriaceae* at the Pitie-Salpetriere Hospital. J Antimicrob Chemother 1984; 14 Suppl B: 59-64.
- 539.- Sirot D, Sirot J, Saulnier P, et al. Resistance to beta-lactams in *Enterobacteriaceae*: Distribution of phenotypes related to beta-lactamase production. J Int Med Res 1986; 14:193-199.
- 540.- Loza Fernandez de Bobadilla E, Martínez-Beltrán J. Evolución de la actividad de cefotaxima en 6 años y fenotipos de sensibilidad en *Enterobacteriaceae*. Enf Infect Microbiol Clin 1988; 6 Suppl 1:3-13.

-
- 541.- Cooksey R, Swenson J, Clark N, Gay E, Thornsberry C. Patterns and mechanisms of β -lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:739-745.
- 542.- Roy C, Segura C, Torrellas A, Reig R, Teruel D, Hermida M. Activity of amoxicillin/clavulanate against β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 Suppl B:41-47.
- 543.- Rodríguez-Creixems M, Cercenado E, Nieto P, García J, Rivera M, Bouza E. Hyperproduction of TEM-1 β -lactamase as mechanism of *E. coli* resistance to the combination of amoxicillin+clavulanic acid. Abstract N $^{\circ}$ 489, 28th ICAAC. Los Angeles, 1988.
- 544.- Martínez JL, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Factors influencing the antibacterial activity of beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. Abstract N $^{\circ}$ 490, 28th ICAAC. Los Angeles, 1988.
- 545.- Medeiros AA, Martínez-Beltrán J, Papa EF, O'Gara C. Comparative efficacy of beta-lactamase inhibitor/antibiotic combinations against clinical isolates of *E. coli* producing different amounts of beta-lactamase. Abstract N $^{\circ}$ 491, 28th ICAAC. Los Angeles, 1988.
- 546.- Page JWJ, Farmer TH, Elson SW. Hyperproduction of TEM-1 β -lactamase by *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23:160-161.
- 547.- Martínez JL, Vicente MF, Delgado Iribarren A, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 33:595.
- 548.- Huovinen S, Huovinen P, Törnainen K, Jacoby GA. Evaluation of plasmid-encoded beta-lactamase resistance in *Escherichia coli* blood cultures isolates. Abstract N $^{\circ}$ 1268, 28th ICAAC. Los Angeles, 1988.
- 549.- Martínez-Beltrán J, Cantón R, Loza E, et al. Resistencia a aminotiazol cefalosporinas y monobactams. Nuevas betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado detectadas en el Hospital Ramón y Cajal. Abstract N $^{\circ}$ C6/9, IV Congreso de la SEIMC. Madrid, 1990.
- 550.- Marre R, Aleksic S. Beta-lactamase types and beta-lactam resistance of *Escherichia coli* strains with chromosomally mediated ampicillin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 1:44-46.
- 551.- Labia R, Brunet G, Gionie M, Philippon A, Heitz M, Pitton JS. Cephalosporinases constitutives de *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 1976; 127B:453-461.
- 552.- Varaldo PE, Nicoletti G, Schito GC, et al. Circulation in Italy of β -lactamase-producing strains within the major groups of bacterial pathogens. *Eur J Epidemiol* 1990; 6:287-292.
- 553.- Verbist L. Incidence of multi-resistance in gram-negative bacterial isolates from intensive care units in Belgium: A surveillance study. *Scand J Infect Dis* 1991; 78 Suppl:45-53.

- 554.- Buirma RJA, Horrevorts AM, Wagenvoort JHT. Incidence of multi-resistant gram-negative isolates in eight dutch hospitals. Scand J Infect Dis 1991; 78 Suppl:35-44.,
- 555.- Chalker RB, Blaser MJ. A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Rev Infect Dis 1988; 10:111-124.
- 556.- Ryder RW, Blake PA, Murlin AC, et al. Increase in antibiotic resistance among isolates of *Salmonella* in the United States 1967-1975. J Infect Dis 1980; 142:485-491.
- 557.- Cherubin CE. Antibiotic resistance of *Salmonella* in Europe and the United States. Rev Infect Dis 1981; 3:1105-1126.
- 558.- MacDonald KL, Coen ML, Hargrett-Bean NT, et al. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. J Am Med Assoc 1987; 258:1496-1499.
- 559.- Alós JI, González-Palacios R, Sánchez-Moreno MP, Calderón P. Alta frecuencia de elevada resistencia a ampicilina en *Salmonella* spp. no typhi. Med Clin (Barcelona) 1990; 95:175-177.
- 560.- Martínez-Beltrán J, Negri C, Morosini M, et al. Acquisition of new plasmid-mediated β -lactamase in an intrahospitalary *Salmonella arizonae* outbreak. Abstract n^o 185, 30th ICAAC. Atlanta, 1990.
- 561.- Archambaud M, Gerbaud G, Labau E, Marty N, Courvalin P. Possible in-vivo transfer of β -lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonella kedougou*. J Antimicrob Chemother 1991; 27:426-436.
- 562.- Poupart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2 a novel cefotaxime from a *Salmonella mbandaka* isolate. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:1498-1500.
- 563.- Saphra I, Winter J. Clinical manifestations of salmonellosis in man: an evaluation of 7779 human infections identified at the New York Salmonella Center. N Engl J Med 1957; 256:1128-1135.
- 564.- González-Palacios R, Aguiar JM, Delgado A, de Rafael L, Loza E, Martínez-Beltrán J. *Salmonella*: Incidencia de aislamiento y patrón de sensibilidad antimicrobiana. Abstract N^o 07/6, II Congreso de la SEIMC, Palma de Mallorca, 1986.
- 565.- Rengnekor UM, Banker DD, Jhole HI. Plasmid-mediated multidrug resistance in *Salmonella typhi*. Lancet 1981; 2:364.
- 566.- Formal SB, Hale TL, Sonsonetti PJ. Invasive enteric pathogen. Rev Infect Dis 1983; 5:702-708.
- 567.- Chugh TD, Amer S. Shigella septicemia. Trop Doct 1983; 13:93-99.
- 568.- Smith JT, Bremner DA, Datta N. Ampicillin resistance in *Shigella sonnei*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 6:418-421.

- 569.- Ling J, Kem KM, French GL. Susceptibility of Hong Kong isolates of multiply resistant *Shigella* spp to 25 antimicrobial agents, including ampicillin plus sulbactam and new 4-quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:20-23.
- 570.- Tauxe RV, Puhr ND, Wells JG, Hargrett-Bean N, Blake PA. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in the USA: the importance of international travelers. *J Infect Dis* 1990; 162:1107-1111.
- 571.- Adler JL, Burke JP, Martin DF, Finland M. *Proteus* infections in a general hospital. 1. Biochemical characteristics and antibiotics susceptibility of organisms. *Ann Intern Med* 1971; 75:517-530.
- 572.- Gómez A, Loza E, Martínez-Beltrán J, Baquero F. Género *Proteus*: Prevalencia y evolución de la resistencia a betalactámicos en un hospital general. *Rev Esp Quimioterap* 1991; 4:217-226.
- 573.- Eickhoff TC, Steinhauer BW, Finland M. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* division. Biochemical and serological characteristics and susceptibility to antibiotics. *Ann Intern Med* 1966; 65:1163-1179.
- 574.- Bottone EJ, Janda JM, Motyl MR, et al. Gastrointestinal tract specimens. In: HP Dalton, HC. Nottebart Jr. *Interpretive Medical Microbiology*. Churchill Livingstone, New York. pp:427-522. 1986.
- 575.- Bouza E, Dominguez A, Mesequer M. et al. *Yersinia enterocolitica* septicemia. *Am J Clin Pathol* 1980; 74:404-409.
- 576.- Cornelis G, Abraham EP. β -lactamases from *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* 1975; 87:273-284.
- 577.- Pham JN, Bell SM, Lanzarone JY. A study of the beta-lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:19-24.
- 578.- Brzostek K, Nichols WW. Outer membrane permeability and porin proteins of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 582:275-277.
- 579.- Gaspar MC, Soriano F. Susceptibility of *Yersinia enterocolitica* to eight β -lactam antibiotics and clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8:161-164.
- 580.- Hornstein MJ, Juppeau AM, Scavizzi MR, Philippon AL, Gremont PAD. In vitro susceptibility of 126 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* to 21 β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:806-811.
- 581.- Gómez-Alfárez A, Baquero F, Cantón R, Loza E, Martínez-Beltrán J. The incidence and beta-lactam resistance of *Proteus vulgaris* in hospital infections: the last decade. *J Chemother* 1991; 3:283-288.
- 582.- Aspiotis A, Cullmann W, Dick W, Stieglitz M. Inducible β -lactamases are principally responsible for the naturally occurring resistance towards β -lactam antibiotics in *Proteus vulgaris*. *Chemotherapy* 1986; 32:236-246.

-
- 583.- Cullmann W, Flensburg TH, Opferkuch W, Stieglitz M, Wiedemann B. Correlation of β -lactamase production and resistance to β -lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae*. Zentbl Bakt Parasit Kde 1982; 252: 480-489.
- 584.- Yang Y, Livermore DM. Chromosomal beta-lactamase expression and resistance to beta-lactam antibiotic in *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:1385-1391.
- 585.- Sawai T, Yoshida T, Tsukamoto K, Yamagishi S. A set of bacterial strains for evaluation of β -lactamase-stability of β -lactam antibiotics. J Antibiot 1981; 34:1418-1426.
- 586.- Martínez-Beltrán J, Ledesma MA, Loza E, Bouza E, Baquero F. In vitro activity of the new cephalosporins HR-756, LY-127935, and T-1551. In: JD Nelson, C. Grassi (Ed). Current Chemotherapy and Infectious Diseases. Proceedings of the 11th ICC and 19th ICAAC. American Society for Microbiology. Washington DC. pp:91-93. 1980.
- 587.- Sanders CC, Sanders WE. Emergence of resistance during therapy with the newer β -lactam antibiotics: role of inducible β -lactamases and implications for the future. Rev Infect Dis 1983; 5:639-647.
- 588.- Dworzack DL, Pugsley MP, Sanders CC, Horowitz EA. Emergence of resistance in gram-negative bacteria during therapy with expanded-spectrum cephalosporins. Eur J Clin Microbiol 1987; 6:456-459.
- 589.- Yannelli B, Schoch P, Cunha BA. *Serratia marcescens*. Clin Microbiol Newsl 1987; 34:157-163.
- 590.- Zak O. Antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. In: LD Sabath (Ed), *Pseudomonas aeruginosa: The Organism, Diseases it Causes, and Their Treatment*. Huber, Berne. pp:133-159. 1980.
- 591.- Hancock REW. Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1986; 18:653-659.
- 592.- Philippon A. Beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. In: DM Livermore (Ed), *Beta-Lactamases: Current Perspectives*. Theracom Ltd, The Hague, The Netherlands. pp:63-81. 1987.
- 593.- Godfrey AJ, Bryan LE. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to new β -lactamase-resistant β -lactams. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26:485-488.
- 594.- Giwercman B, Hoyby N. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to beta-lactam antibiotics. Infect Dis News 1991; 10:97-101.